Regulation der Biosynthese des Sesquiterpens Pentalenolacton in Streptomyces arenae TÜ 469

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Karl-Heinz Maurer
aus Ravensburg

1984

Regulation der Biosynthese des Sesquiterpens Pentalenolacton in Streptomyces arenae Tü 469

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Karl-Heinz Maurer
aus Ravensburg

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	7.November 1984
Dekan:	Prof. Dr. K.A.Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D.Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.Zähner

Abstract

Maurer, Karl-Heinz

Regulation der Biosynthese des Sesquiterpens Pentalenolacton in Streptomyces arenae Tü 469

Streptomyces arenae Tü 469 bildet das Sesquiterpen Pentalenolacton (PL) während der Wachstumsphase in definierten Medien. Durch Bestimmung der PL-Produktion in Submerskulturen von S.arenae Tü 469 in Abhängigkeit vom Kulturmedium sowie durch Untersuchung von Enzymen des Primär- und Sekundärmetabolismus wurden verschiedene Faktoren, die die Bildung von Pentalenolacton beeinflussen können, nachgewiesen.

Die Bildung von Pentalenolacton unterliegt einer vielfältigen Regulation. Durch N-Quellen wie Leucin, Glycin und N-Quellen komplexer Zusammensetzung wird die PL-Bildung gehemmt. Bei Verfütterung von unpolaren C-Quellen wie Humulen und Squalen erfolgt ebenfalls eine Hemmung der Produktbildung. Diese beruht den Untersuchungen zufolge wahrscheinlich auf einer kompetitiven Hemmung oxidierender Enzyme, deren physiologisches Substrat die PL-Vorstufe Pentalenen darstellt. Glucose bewirkt keine ausgeprägte Katabolitrepression.

Zum Zeitpunkt maximaler PL-Produktion fällt der spezifische ATP-Gehalt der Zellen drastisch ab, und zwar umso stärker, je mehr PL gebildet wird.

Ausgehend von der HMG-CoA Reduktase wurden die Enzyme der PL-Biosynthese in ihrem Aktivitätsverlauf während einer Kultur getestet. Das limitierende Enzym für die PL-Synthese stellt die Farnesylpyrophosphat Zyklase dar. Dieses Enzym katalysiert sehr spezifisch nur die Bildung von Pentalenen; andere mono- oder sesquiterpenzyklisierende Aktivitäten konnten nicht nachgewiesen werden. Die Aktivität der Farnesylpyrophosphat Zyklase unterliegt einer Endprodukthemmung durch PL-Methyläther, PL und möglicherweise andere PL-Derivate.

Die Resistenz von S.arenae gegen PL beruht auf der Synthese von zwei unterschiedlich sensitiven Isoenzymen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase mit unterschiedlichen Molekulargewichten von Untereinheiten und nativem Enzym. Es konnte keine Interkonvertierbarkeit zwischen beiden Enzymen nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Zähner vom Institut für Biologie II der Universität Tübingen möchte ich für wertvolle Anregungen und sein Interesse an meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. G. Höfle von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig-Stöckheim danke ich für die Anfertigung und Interpretation der NMR-Spektren. Gleichfalls danken möchte ich Herrn Dr. J. Lehmann (GBF) für seine Unterstützung bei der Durchführung und Optimierung von Fermentationen.

Herrn Prof. Dr. H. Shirahama von der Hokkaido University in Sapporo danke ich für die Oberlassung einer ausführlichen Beschreibung der Synthese von (±) Pentalenen.

Herrn Dr. W. Oberrauch danke ich für die Aufnahme von FTIR-Spektren und Herrn Dr. D. Zdunek für die Oberlassung der Spektren von Pentalenolacton-Chlorhydrin. Außerdem möchte ich mich bei allen Laborkollegen für hilfreiche Diskussionen und das gute Arbeitsklima bedanken.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	
2.1	Materialien	11
2.1.1	Enzyme	11
2.1.2	Coenzyme und Substrate	11
2.1.3	Ausgangsverbindungen für Synthesen	12
2.1.4	Lösungen für die Elektronenmikroskopie	13
2.1.5	Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie	14
2.1.6	Radiochemikalien	16
2.1.7	Kulturmedien	16
2.1.8	Säulenmaterialien	18
2.2	Organismen	19
2.3	Geräte	20
2.4	Methoden	21
2.4.1	Anzucht der Streptomycetenstämme	21
2.4.2	Biochemische Bestimmungen	21
2.4.2.1	Proteinbestimmung	21
2.4.2.2	Bestimmung der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase Aktivität	22
2.4.2.3	Bestimmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase Aktivität	23
2.4.2.4	Bestimmung der Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase Aktivität	23
2.4.2.5	Bestimmung der Isopentenylpyrophosphat Isomerase Aktivität	26
2.4.2.6	Bestimmung der Dimethylallyl-, Geranyl- und Terpenoidallyl Transferasen	27
2.4.2.7	Bestimmung der Farnesylpyrophosphat Zyklase	28
2.4.2.8	Weitere enzymatische Bestimmungen	30
2.4.2.9	Bestimmung des ATP-Gehalts der Zellen	30

2.4.2.10	Bestimmung der Pentalenolactonkonzentration	31
2.4.2.11	Bestimmung der Myceltrockengewichte	31
2.4.2.12	Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen	31
2.4.3	Messung der Radioaktivität	32
2.4.4	Analytische Trennmethoden	33
2.4.4.1	Analytische HPLC	33
2.4.4.2	Gaschromatographie	34
2.4.4.3	Elektrophoretische Methoden	34
2.4.5	Isolierung von Pentalenolacton, Vorstufen und Derivaten	36
2.4.5.1	Isolierung von Pentalenolactonen	36
2.4.5.2	Isolierung des Pentalenolacton-Methyläthers	38
2.4.5.3	Isolierung der Pentalensäure	38
2.4.5.4	Versuche zur Isolierung von Pentalenen aus Kulturfiltrat und aus Zellen von S.arenae TO 469	40
2.4.6	Synthesen und chemische Umsetzungen	41
2.4.6.1	Synthese von Isopentenylpyrophosphat	41
2.4.6.2	Synthese von Dimethylallylpyrophosphat	43
2.4.6.3	Synthese von Geranylpyrophosphat	44
2.4.6.4	Synthese von Farnesylpyrophosphat	44
2.4.6.5	Enzymatische Synthese von (1-^{14}C) trans-trans-Farnesylpyrophosphat	45
2.4.6.6	Enzymatische Synthese von (U-^{14}C)2-Ketoisocapronsäure	48
2.4.6.7	Synthese von (±)Pentalenen aus Humulen	48
2.4.6.8	Hydrolyse von Glycerinaldehyd-3-phosphat diäthylacetal	53
2.4.7	Vorbereitung und Einbettung von Proben für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen	53
2.4.7.1	Einbettung der Proben für die Lichtmikroskopie	54
2.4.7.2	Vorbereitung und Einbettung der Proben für die Elektronenmikroskopie	54
2.4.8	Enzymisolierungen und Proteaseansätze	55
2.4.8.1	Isolierung von PL-sensitiver und -insensitiver GAPDH aus S.arenae TO 469	55
2.4.8.2	Proteolyseansätze von gereinigter GAPDH aus Streptomyceten mit Papain und Clostripain	56

2.4.8.3 Anreicherung von Mannit Dehydrogenase aus S.arenae 57
2.4.8.4 Präparation einer Enzymfraktion aus Rattenleber zur enzymatischen Synthese von trans-trans-Farnesylpyrophosphat 57

3. Ergebnisse

3.1 Wachstum und Pentalenolactonproduktion von Streptomyces arenae TO 469 in komplexem und definiertem Medium 59

3.2 Regulation der Pentalenolacton-Resistenz von S.arenae TO 469 über die Isoenzyme der GAPDH 71

3.3 Produktion von Pentalenolacton in Abhängigkeit von der Medienzusammensetzung 82
3.3.1 Abhängigkeit der PL-Produktion von der Mineralsalzkonzentration in Minimalmedium 82
3.3.2 Verwertung von Mannit 85
3.3.3 Verwertung anderer Kohlenstoff- und Stickstoffquellen 86
3.3.4 Produktion von PL nach Verfütterung von Vorstufen der Pentalenolactonbiosynthese 89
3.3.5 PL-Produktion unter dem Einfluß von Chloroquin und Phenobarbital 95
3.3.6 Einfluß supplementierter Aminosäuren auf die PL-Produktion von S.arenae TO 469 in Minimalmedium und Resting cell Medium 96
3.3.6.1 Regulatorische Wirkung von Aminosäuren 96
3.3.6.2 Einfluß der Asparagin-Konzentration auf die PL-Bildung 106

3.4 Zeitlicher Verlauf der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und des spezifischen ATP-Gehalts während der Kultur von S.arenae in Minimalmedium 109

3.4.1	Verlauf der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase	109
3.4.2	Verlauf des spezifischen ATP-Gehalts	110
3.5	Messung der Aktivität von Enzymen der Pentalenolactonbiosynthese	113
3.5.1	Messung der HMG-CoA Reduktase	113
3.5.2	Messung der Aktivität der Isopentenylpyrophosphat Isomerase, der Dimethylallyl- und Geranyl-Transferase und der Terpenoid-Allyl Transferase	116
3.5.3	Aktivität der Farnesylpyrophosphat Zyklase	118
3.6	Einfluß von Metaboliten auf die Aktivität der PL-Biosyntheseenzyme in vitro	123
3.6.1	Untersuchung der HMG-CoA Reduktase	123
3.6.2	Untersuchung der FPP Zyklase	124
3.7	Strukturaufklärung des Hemmstoffs der FPP-Zyklase	127
4.	Diskussion	
4.1	Problematik pelletartigen Wachstums von S.arenae unter Minimalmedienbedingungen	137
4.2	Regulation der GAPDH Isoenzyme	139
4.3	Diskussion der Medienoptimierung und der Verfütterung von Vorstufen	140
4.4	Diskussion der gemessenen Aktivitäten von PL-Biosyntheseenzymen	143
4.5	Regulation der Pentalenolactonbildung	148
4.5.1	Regulation über die Aktivität der Biosyntheseenzyme	148
4.5.2	Regulation der PL-Bildung über Produkthemmung	149
4.5.3	Zusammenhang von PL-Bildung und spezifischem ATP-Gehalt	152
4.5.4	Hemmung der PL-Bildung durch Aminosäuren	153
4.6	Ausblick	155
5.	Literaturverzeichnis	157

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md.,USA
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
FPP	Farnesylpyrophosphat
tt-FPP	trans-trans Farnesylpyrophosphat
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
G6PDH	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
GPP	Geranylpyrophosphat
h	Stunde(n)
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutarsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HPTLC	hochauflösende Dünnschichtchromatographie
HPLC	hochauflösende Flüssigchromatographie
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KIC	2-Ketoisocapronsäure
MES	2-(N-Morpholino)-Äthansulfonsäure
min	Minute(n)
MVA	Mevalonsäure
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PEG	Polyäthylenglykol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-äthansulfonsäure)
PL	Pentalenolacton
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
S.	Streptomyces
THF	Tetrahydrofuran
TÜ	Stammsammlung des Instituts für Biologie II Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Universität Tübingen

1. Einleitung

Das Antibiotikum Pentalenolacton wurde unter der Bezeichnung PA 132 1956 von Koe et al. im Kulturfiltrat eines Streptomycetenstammes entdeckt (53). Takeuchi et al. (106) legte den ersten Strukturvorschlag vor, aufgrund dessen sie der Substanz den Namen Pentalenolacton gaben. Dieser Vorschlag postulierte irrtümlich die Lage eines Epoxids an einem 7-Ring-Lacton, erwies sich aber in der Annahme eines Pentalengrundgerüsts als richtig. 1970 erfolgte die Korrektur dieses Strukturvorschlags durch Martin et al. (59), die die exozyklische Lage des Epoxids belegte und zur in Abb.1 dargestellten Strukturformel von Pentalenolacton führte.

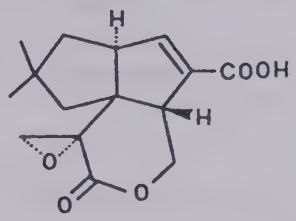
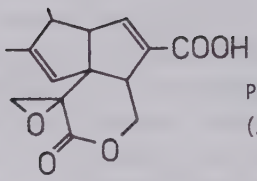
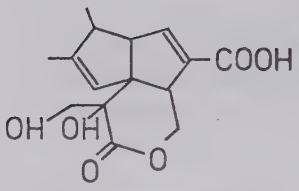


Abb. 1:
Pentalenolacton

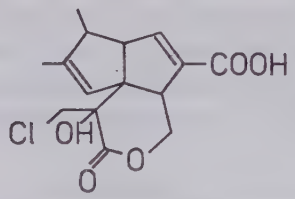
Seither sind eine ganze Anzahl von Substanzen identifiziert worden, die als Vorstufen oder Derivate von Pentalenolacton angesehen werden können. 1972 beschrieben Keller-Schierlein et al.(49) unter der Bezeichnung Arenaemycin E, D und C die Isolierung von Pentalenolacton und dem Diol- und Chlorhydrinderivat aus S.arenae TÜ 469 (Abb.2). Das Arenaemycin C wurde von Aizawa et al. 1978 unter der Bezeichnung AA 57 nochmals beschrieben (2). Die Identität von PL und Arenaemycin wurde durch die Strukturarbeiten von Takeuchi et al. (106) und Martin et al. (59) bestätigt. In der Folge beschrieben Seto et al. die Isolierung der Pentalenolactonvorstufen Pentalenen (93), Pentalensäure (92) und Pentalenolacton G (91). Takahashi beschrieb ein Desoxypentalenylglucuron (104), und Tillman und Cane das Pentalenolacton F (108). Anhand dieser Bestimmungen stellten Ohtsuka et al. den in Abb. 3 dargestellten hypothetischen Biosyntheseweg von Pentalenolacton, ausgehend vom Sesquiterpen Pentalenen, zusammen (68).



Pentalenolacton
(Arenaemycin E)



PL-Diol (Arenaemycin D)



PL-Chlorhydrin (Arenaemycin C)

Abb.2
Pentalenolacton-Verbindungen aus S.arenae TO 469

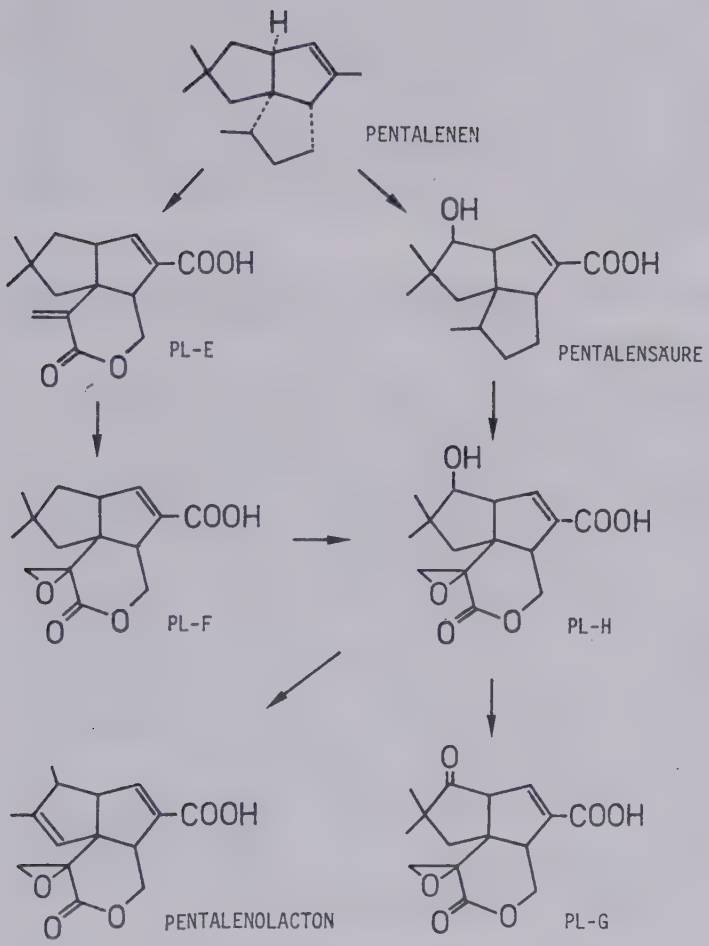


Abb.3
Hypothetischer Biosyntheseweg von Pentalenolacton ausgehend von Pentalenen nach Ohtsuka (68)

Die Struktur von Pentalenolacton konnte 1978 durch die stereospezifische Totalsynthese von d,l-Petalenolacton durch Danishefsky (25) bestätigt werden. Von Paquette und Annis wurden weitere Totalsynthesen für Pentalenolacton (70,71) und für Pentalenen (4,72) beschrieben. Die erste Synthese von Pentalenen und Pentalensäure wurden von Matsumoto und Shirahama durchgeführt (65,67). Sie versuchten, einen Syntheseweg zu finden, der, ausgehend vom Sesquiterpen Humulen, möglichst analog zu hypothetischen Reaktionsschritten der Biosynthese verlaufen sollte (siehe Abb.8 und 9 unter 2.4.6.7).

In biologischen Testsystemen wirkte Pentalenolacton (PL) gegen ein breites Spektrum grampositiver und gramnegativer Bakterien, gegen Protozoen und Pilze (2,34,56). Die ersten Angaben zum Wirkmechanismus stammten von Lemke, der aus der Abhängigkeit der Hemmwirkung von der C-Quelle der getesteten Organismen schloß, daß der Wirkort ein glykolytisches Enzym sei. Es gelang ihm, eine Hemmung der Pyruvat-Kinase nachzuweisen (56). Im Anschluß hieran konnte Hartmann zeigen, daß das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) der spezifische Wirkort der Substanz ist, und daß die Pyruvat-Kinase erst bei weit höheren Konzentrationen gehemmt wird (42). Duszenko et al. untersuchten die Wirkung von Pentalenolacton auf den Glucosemetabolismus und den Energiestoffwechsel in eukaryontischen Zellen (31,32). Der Wirkmechanismus von Pentalenolacton bei der Inaktivierung der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase wurde von Zdunek untersucht (117). Außerdem konnten in dieser Arbeit weitere Belege für eine GAPDH-spezifische Wirkung vorgelegt werden, während Grein (40) beim Test antibiotisch wirkender Sesquiterpenlactone aus Pflanzen eine Inaktivierung der GAPDH ausschließen konnte.

In allen bisher untersuchten Organismen konnte die GAPDH (E.C. 1.2.1.12) durch PL inaktiviert werden. Es wurden bisher nur wenige GAPDH-Aktivitäten nachgewiesen, die deutlich geringere Sensitivität gegenüber PL aufwiesen. Mann (58) konnte bei Untersuchung der Inaktivierung von GAPDH aus Pflanzen eine 25fach geringere relative Sensitivität der Chloroplasten-GAPDH

(E.C.1.2.1.13, NAD(P)-spezifisch) und eine 150fach geringere relative Sensitivität der NADP-spezifischen, nicht-phosphorylierenden GAPDH (E.C.1.2.1.9), verglichen mit dem Enzym aus Kaninchenmuskel, nachweisen. Bei der Untersuchung der GAPDH aus dem PL-Produzenten S.arenae TÜ 469 gelang Pfeiffer (74) und Maurer (61) der Nachweis und die Isolierung von zwei unterschiedlich PL-sensitiven GAPDH-Isoenzymen (E.C.1.2.1.12, NAD-spezifisch). Das PL-sensitive Enzym zeigte eine 100fach geringere Empfindlichkeit gegenüber PL und das PL-insensitive Enzym eine Verringerung der Empfindichkeit um den Faktor 10^5 im Vergleich zum Kontrollenzym aus Kaninchenmuskel (62).
Der Produzent S.arenae TÜ 469 schützt sich vor seinem Produkt folglich durch die Insensitivität des Wirkorts.

Die Aufklärung der Biogenese des Sesquiterpens Pentalenolacton beruht zu einem großen Teil auf den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Cane. Durch Verfütterung von ^{13}C-markierter Glucose an den PL-Produzenten Streptomyces UC 5319 und anschließender Isolierung und ^{13}C-NMR-Analyse des gebildeten Pentalenolactons konnten sie nachweisen, daß PL über den Mevalonsäureweg synthetisiert wird (13,15). Nach Entdeckung des Kohlenwasserstoffs Pentalenen durch Seto und Yonehara (93) gelang Cane und Tillman 1983 die Messung einer Enzymaktivität, die Farnesylpyrophosphat zu Pentalenen zyklisiert, im Rohextrakt von Streptomyces UC 5319 (17,18). Damit war belegt, daß die Biosynthese von Pentalenolacton über Mevalonsäure und über Farnesylpyrophosphat verläuft. Die zuletzt zitierten Arbeiten erschienen während der Durchführung der hier beschriebenen Untersuchungen.
Der Isoprenoidsyntheseweg (s. Abb.4) dient Bakterien, soweit sie keine Carotinoide bilden, zur Synthese wichtiger Komponenten der Plasmamembran, nämlich von Undecaprenylmonophosphat, das Carrierfunktion bei der Zellwandsynthese besitzt, und von Hopanen und Menachinon. Die Hopane sind Triterpenderivate, die das Cholesterin in der Bakterienmembran ersetzen.
Menachinone setzen sich aus Menadion und einem unterschiedlich hydrierten, i.a. aus 9 Isopreneinheiten bestehenden Prenylrest zusammen und stellen das wasserstoffübertragende Coenzym der

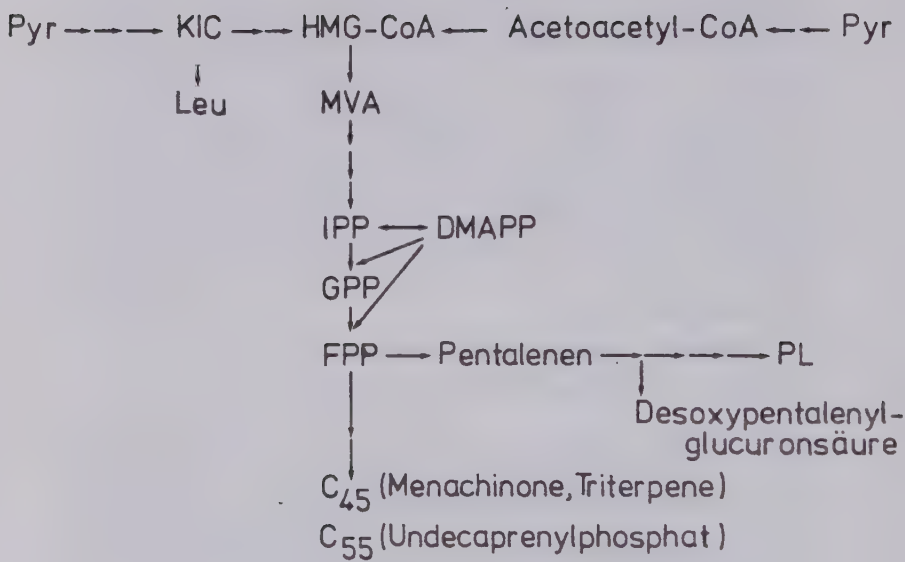


Abb. 4:
Prinzip der Isoprenoidsynthese in Pentalenolacton-produzierenden Streptomyceten
Abkürzungen: Pyr - Pyruvat, KIC - Ketoisocapronsäure, Leu - Leucin, MVA - Mevalonsäure, IPP - Isopentenylpyrophosphat, GPP - Geranylpyrophosphat, FPP - Farnesylpyrophosphat, PL - Pentalenolacton

bakteriellen Atmungskette dar. Sowohl Hopane wie auch Menachinone wurden in Streptomyces-Arten nachgewiesen und können zu taxonomischen Zwecken verwendet werden (20,83). Auf Vertreter der Gattung Streptomyces beschränkt ist dagegen die Fähigkeit zur Synthese von Sesquiterpenen, die ansonsten in Bakterien nicht nachgewiesen werden können (siehe Abb.4). Eudesman- und Cadinanalkohol sowie die verschiedenen Pentalenolactone stellen die einzigen bisher in Bakterien nachgewiesenen Sesquiterpene dar (16). Die Fähigkeit zur Bildung von Pentalenolactonen wurde inzwischen in einer ganzen Anzahl von Streptomycetenstämmen nachgewiesen (69). In Pflanzen und Pilzen dagegen werden Sesquiterpene in großer Zahl und Vielfalt gebildet. Es erscheint bemerkenswert, daß 3 Isomere des Pentalenens, nämlich Silphinen, Isocomen und Senoxyden, in Pflanzen der Gattung Compositae nachgewiesen wurden, nicht dagegen Pentalenen (8,9,10).

Die Enzyme der Isoprenoidsynthese sind bei Eukaryonten im Hinblick auf die Cholesterinsynthese der Säugetierleber sehr gut untersucht. Bei Prokaryonten liegen bisher nur vereinzelte Untersuchungen vor; bei Streptomyceten war bisher nur eine Messung der Farnesylpyrophosphat Zyklase durch Cane beschrieben (siehe Abb.5). Über die Regulation dieses Stoffwechselwegs gibt es bislang ebenfalls nur Untersuchungen, die die eukaryontische Cholesterinsynthese betreffen. Dort stellt die Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase das Schlüsselenzym dar, das in vielfältiger Weise reguliert wird (30).

Am Beginn der vorliegenden Arbeit stand die Hypothese, daß auch in S.arenae TÜ 469 die Regulation der Sesquiterpensynthese über die Regulation der HMG-CoA Reduktase verlaufen könnte. Ziel der Arbeit war es, ausgehend von der HMG-CoA Reduktase, die Aktivität der Enzyme der PL-Biosynthese in ihrem Verlauf während einer Kultur zu messen (siehe Abb. 5). Hierbei sollte besonders nach Enzymaktivtäten gesucht werden, die limitierend auf die Bildung von Pentalenolacton wirken könnten. Gleichzeitig sollte die , wie die Ergebnisse von Zdunek zeigten (116), offenbar stark ausgeprägte Regulation der PL-Produktion so weit als möglich aufge-

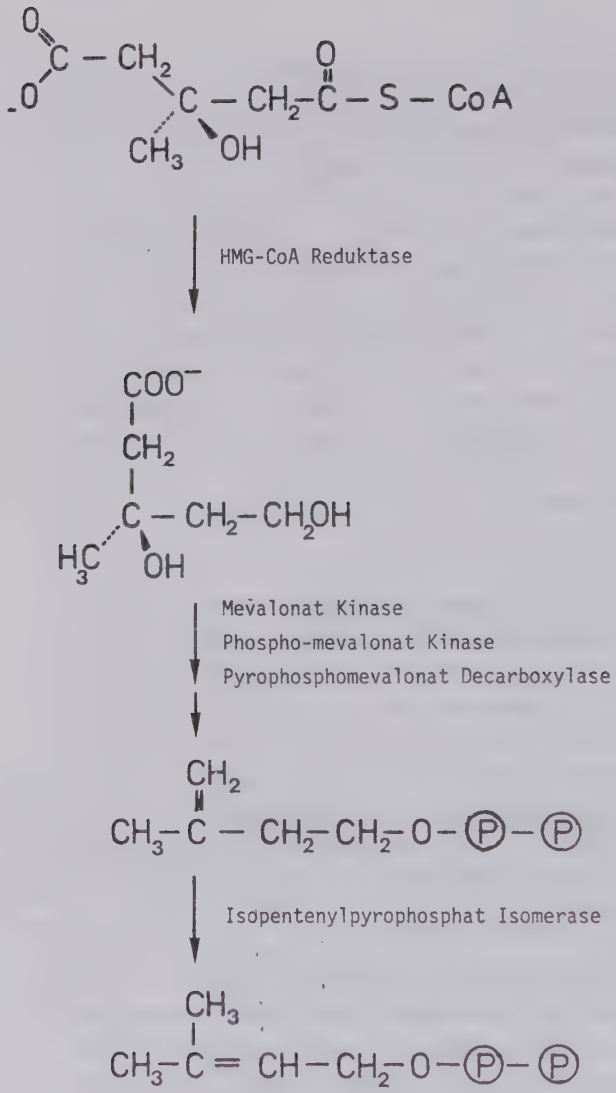
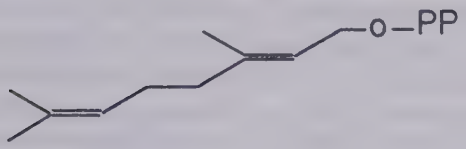


Abb. 5:
Enzyme der Sesquiterpensynthese in Pentalenolacton-produzierenden Streptomyceten

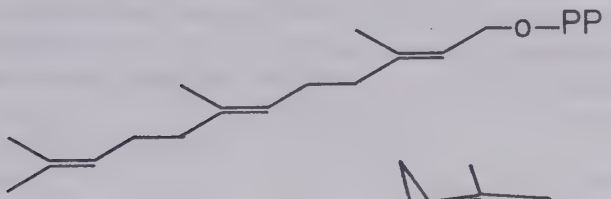
IPP + DMAPP ⟶ trans - GPP

Dimethylallyltransferase

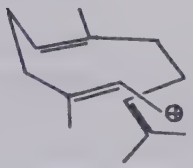


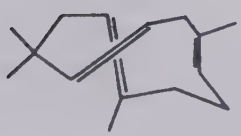
IPP + GPP ⟶ trans - trans - FPP

Geranyltransferase

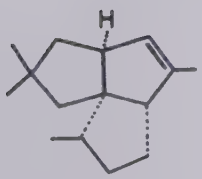


Farnesylpyrophos-
phat Zyklase





HUMULEN



PENTALENEN

klärt werden. Da PL in nicht-produzierende Kulturen von S.arenae neben der Hemmung der sensitiven GAPDH auch die Bildung PL-insensitiver GAPDH bewirkt (62), sollte die Hypothese geprüft werden, wonach PL oder Folgeprodukte von PL durch Regulation des Sekundärmetabolismus den Verlauf der Differenzierung beeinflussen könnten. Im Zusammenhang mit den Isoenzymen der GAPDH von S.arenae Tü 469 sollte der Verlauf ihrer Aktivitäten in einer PL-produzierenden Kultur und eine mögliche Interkonversion der Isoenzyme untersucht werden.

Ein weiteres Ziel war die Optimierung der Medien- und Fermentationsbedingungen für S.arenae TÜ 469 im Sinne einer Produktionssteigerung. Dieses Ziel sollte durch Verfütterung eventuell limitierter Vorstufen sowie durch Optimierung des Gehalts an Mineralsalzen und der Suche nach optimalen C-Quellen erreicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme

L-Aminosäureoxidase	Crotalus terr.terr.	Fa.Boehringer
Clostripain	Clostridium histolyticum	"
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase(GAPDH)	Kaninchenmuskel	"
"	Hefe	"
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)	Hefe	"
Katalase	Rinderleber	"
Lactat-Dehydrogenase(LDH)	Schweineherz	"
Lysozym		Sigma
Malat-Dehydrogenase (MDH)	Schweineherz	Fa. Boehringer
Papain	Papaya	Fa. Merck
3-Phosphoglycerat-Kinase	Hefe	Fa. Boehringer

2.1.2 Coenzyme und Substrate

Adenosintriphosphat (ATP)	Fa. Boehringer
Adenosindiphosphat (ADP)	"
Glucose-6-phosphat	"
Glycerinaldehyd-3-phosphat Diäthyl-acetal (Cyclohexylammoniumsalz)	"
Hydroxymethylglutarsäure (HMG)	Fa. Sigma
Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA)	"
2-Ketoisovaleriansäure	"
2-Ketosiocapronsäure (KIC)	"
DL-Mevalonsäure (MVA)	Fa. Calbiochem
Mevalonsäurelacton	Fa. Sigma
NAD	Fa. Boehringer
NADP	"
NADH	"
NADPH	"
Cholesterin	Fa. Ega-Chemie
Squalen	Fa. Merck

2.1.3 Ausgangsverbindungen für Synthesen

Äthylamin	Fluka (Neu-Ulm)
Dimethylallylalkohol	Ega-Chemie
(3-Methyl-2-buten-1-ol)	(Steinheim)
Farnesol	Fluka (Neu-Ulm)
Geraniol	Serva (Heidelberg)
Humulen	Roth,Fluka
Isopentenol	Ega-Chemie
(3-Methyl-3-buten-1-ol)	
Jodessigsäure	Sigma (München)
Kaliumborhydrid	Sigma
1-Methyl-3-Nitro-	
-1-Nitrosoguanidin (MNNG)	Ega-Chemie
Phosphor(III)bromid	Riedel de Haen (Seelze)
Quecksilber(II)nitrat-1-hydrat	Merck (Darmstadt)
Trichloracetonitril	Merck

Alle übrigen verwendeten Lösungsmittel, Säuren und Salze wurden in analysenreiner Form von den Firmen Merck, Darmstadt, und Fluka, Neu-Ulm bezogen. Nicht aufgeführte biochemische Feinchemikalien stammten von den Firmen Serva, Heidelberg, Sigma, München und Boehringer, Mannheim.

2.1.4 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

Waschlösung
100 ml Phosphatpuffer (72.6 ml 0.067M Na_2HPO_4
+ 27.4 ml 0.067M KH_2PO_4
60 ml H_2O bidest.
20 ml $MgSO_4$ 0.001M

Osmiumtetroxidlösung
5 ml Phosphatpuffer
1 ml 0.001M $MgSO_4$
0.5 ml H_2O
2.5 ml 4% OsO_4-Lösung

Eponmischung A:
I. 62 ml Epikote
100 ml Härter DBA

II. 100 ml Epikote
89 ml Härter MNA
Beide Mischungen wurden bei +4°C aufbewahrt.

Eponmischung B:
3 Teile I und 7 Teile II wurden gut verrührt, 1% Beschleuniger DMP-30 zugefügt und gut verrührt. Luftblasen wurden mit Ultraschall entfernt.
Sämtliche angegebenen Chemikalien stammten von der Fa. Roth (Karlsruhe).

2.1.5 Anfärbereagenzien für die von Dünnschichtchromatographie

Anisaldehyd-, Dimethylaminobenzaldehyd- oder Vanillinreagenz zur Anfärbung von Sesquiterpenlactonen nach Picman (75)

0.5 g Vanillin, p-Dimethylaminobenzaldehyd oder
m-Anisaldehyd wurden in einer Lösung aus
9 ml Äthanol (95%)
0.5 ml konz. Schwefelsäure und
3 Tropfen Eisessig gelöst.

Das Reagenz wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt. Die besprühten Platten wurden anschließend auf 70 - 90°C erwärmt.

Ammoniummolydat-Perchlorsäure-Reagenz nach Hanes und Isherwood (Stahl(100))

Das Reagenz wurde zum Nachweis von Phosphorsäureestern und Pyrophosphatverbindungen benutzt.

0.5 g Ammoniummolydat wurden in 5 ml Wasser gelöst,
1.5 ml (25%) Salzsäure und
2.5 ml (70%) Perchlorsäure hinzugefügt.

Nach Abkühlen wurde mit Aceton ad 50 ml aufgefüllt. Das Reagenz wurde 24 h nach Ansetzen benutzt und ist mehrere Wochen haltbar. Die besprühten Platten wurden schwach erwärmt und anschließend entweder unter langwelligem UV oder bei 100°C 10 min nachbehandelt.

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz zum Nachweis von Terpenen (100)

0.5 ml Anisaldehyd wurden in 50 ml Eisessig gelöst und 1 ml konz. Schwefelsäure zugesetzt. Das Reagenz muß frisch angesetzt werden. Die Platten wurden nach dem Ansprühen 10 min erhitzt.

Antimon(III)clorid-Eisessig zum Nachweis von Terpenen auf Silbernitrat-imprägnierten Platten

20 g Antimon(III)chlorid wurden in einem Gemisch aus 20 ml Eisessig und 60 ml Chloroform gelöst. Die besprühten Platten wurden anschließend 5 min auf 100°C erhitzt und in langwelligem UV betrachtet.

Bromkresolgrün-Bromphenolblau-Kaliumpermanganat-Reagenz (7)

Das zum Nachweis organischer Säuren geeignete Reagenz wurde zur Identifizierung von Mevalonsäure und Mevalonolacton verwendet.
Lösung A; 0.075 g Bromkresolgrün und 0.025 g Bromphenolblau wurden in 100 ml Äthanol gelöst.
Lösung B: 0.25 g Kaliumpermanganat und 0.5 g Natriumcarbonat wurden in Wasser ad 100 ml gelöst.

Sprühreagenz: 9 Volumenteile Lösung A und 1 Volumenteil Lösung B wurden gemischt und sofort verwendet.

Dichlorphenolindophenol-Natrium zum Nachweis organischer Säuren und Methylester (100)

Das Reagenz wurde zum Nachweis von organischen Säuren und Methylestern bei der Pentalensäuremethylestersynthese verwendet.
0.1% 2,6-Diclorphenolindophenol-Natrium-Lösung in Äthanol wurde aufgesprüht und die Platten kurz erwärmt.

Ehrlichs-Reagenz (4-Dimethylaminobenzaldehyd-Salzsäurereagenz)

1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wurde in einem Gemisch aus 25 ml Salzsäure (36%) und 75 ml Methanol gelöst. Die besprühten Platten wurden anschließend 10 min auf 70°C erwärmt.

Das Reagenz reagiert nicht nur mit Aminen, sondern auch mit einer ganzen Anzahl niedermolekularer Naturstoffe (35).

2.1.6 Radiochemikalien

(U-^{14}C)-Glycin	Amersham Buchler, Buckinghamshire
L(U-^{14}C)-Leucin	"
(1-^{14}C)Isopentenylpyrophosphat	"
^{3}H-Pentalenolacton-Chlorhydrin	"
Tritium-Markierung nach Code TR 8	"
DL-3-(glutaryl-3-^{14}C)-Hydroxy-methylglutaryl Coenzym A	New England Nuclear, Boston,Mass.

2.1.7 Kulturmedien

Alle Medien für Submerskulturen und Stammhaltung wurden 20 min bei 120°C im Autoklaven sterilisiert. Zur Herstellung von festen Medien wurden jeweils 2% Agar zugegeben. In der folgenden Aufzählung beziehen sich alle Angaben auf 1 l entionisiertes Wasser. Alle komplexen Medienbestandteile wurden von der Fa. Difco bezogen.

Wickerham Medium:

3 g Hefe-Extrakt
3 g Malzextrakt
5 g Bacto-Pepton
30 g Glucose pH 7.0

Minimalmedium nach Zygmunt (118), modifizierte Form nach Zdunek (116):

1.0 g NaCl
3.0 g K_2HPO_4 x 3 H_2O
1.0 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
2.0 g $(NH_4)_2SO_4O$,
0.4 g $CaCl_2$ x $2H_2O$
20 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O
10 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O
2.5 g Asparagin
40 g Mannit pH 6.2

Resting cell Medium:

1 g NaCl
1 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
2 g $(NH_4)_2SO_4$
4 g $CaCl_2$ x 2 H_2O
100 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O
10 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O
2,5 g Asparagin
40 g Mannit
15 mMol MES

wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst und mit Schwefelsäure ein pH von 6.2 eingestellt.

PL-Produktionsmedium nach Aizawa (2):

50 g Glycerin
10 g Glucose
10 g Malzextrakt
20 g Sojamehl
2 g $CaCO_3$ pH 7.5

PL-Produktionsmedium nach Sobin et al. (98):

10 g Stärke
10 g Glucose
5 g Malzextrakt
10 g Sojamehl
1 g $CaCO_3$ pH 7.0

Minimalmedium nach Abschluß der Optimierungsversuche der vorliegenden Arbeit:

3 g K_2HPO_4 x 3 H_2O
1 g NaCl
1 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
4 g $CaCl_2$ x 2 H_2O
100 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O
10 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O
7.5 g Asparagin
30 g Mannit pH 6.5

2.1.8 Säulenmaterialien

Amberlite XAD-2, 20 - 50 mesh,	Sigma, München
Biogel HTP	Biorad, München
Biogel P6	"
Biogel A 0.5 m	"
DEAE-Sephacel	Pharmacia
Dowex Ag 1 x 8	Serva
Kieselgel 60	Merck,Darmstadt
Sephadex LH 20	Pharmacia

2.2 Organismen

Gegenstand der Untersuchung war der Stamm Streptomyces arenae TÜ 469. Der Stamm wurde am Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen aus einer Bodenprobe aus Obervolta isoliert und als Streptomyces arenae identifiziert. Hier erfolgte auch die Entdeckung seiner Eigenschaft als Produzent von Arenaemycin (PL). Der Stamm ist von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen unter der Nummer DSM 40 734 zu beziehen.
Für vergleichende Messungen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) folgende Stämme bezogen, die teilweise als Produzenten von Pentalenolacton beschrieben waren:
S.roeogriseus,DSM 40 488; S.griseochromogenes,DSM 40 499;
S.cromofuscus,DSM 40 273.
Als Vertreter von Streptomycetenstämmen, die kein PL produzieren können, wurde ein Stamm S.virginiae, sowie zwei nicht näher charakterisierte Stämme mit der Bezeichnung B 10 und B 108 aus der Sammlung von Herrn Dr. Wolf, Institut für Biologie II, Universität Tübingen, untersucht.

2.3 Geräte

Einstrahl-Photometer	55 B	Perkin-Elmer, Oberlingen, BRD
Zweistrahl-Photometer	UV 210	Shimadzu, Kyoto, Japan
IR-Spectrophotometer	FTS-IMX	Digilab (Bio-Rad),Richmond,USA
Fluoreszenz-Spectrometer	Modell 1000	Perkin-Elmer,Oberlingen,BRD
UV-Detektor	BT 3030	Biotronik,Maintal,BRD
Potentiometer-Schreiber	Servogor S	Goerz, Wien, Österreich
Hochdruckflüssigchromatograph (HPLC)	SP 8000	Spectra-Physics, Santa-Clara, USA
Szintillationszähler	BF 5003	Berthold, Wildbad, BRD
Gaschromatograph	LT-Programmer 232 Electrometer Mod.180 Fractovap. Ser. 2150	Carlo Erba, Hofheim, BRD
Sterile Werkbank		Centronik, Berlin
Autoklav	FO/ 3-Z1	Fedegari, Padua, Italien
Fermenter (20 l)	Intensor b 20	Giovanola Frêres, Monthey, CH
Ultraschallgerät	Sonifier B 12	Branson, Danbury, USA
Brutschrank	Lab-Shaker	Braun, Melsungen, BRD
Durchlichtmikroskop	Ortholux II	Leitz, Wetzlar, BRD
Foto-Aufsatz	Leica	Leitz, Wetzlar, BRD
Mikrotom	Ultratome 4800	LKB, Bromma, Schweden
Elektronenmikroskop	EM 109	Zeiss, Oberkochen, BRD
Luminometer	Biocounter M 2010	Lumac, Titusville, USA
Lyophilisator	L-05	WKF, Darmstadt, BRD
Fraktionssammler	Ultrorac 7000	LKB, Stockholm, Schweden
Gelelektrophorese-Apparatur	Modell 220	Bio-Rad, Richmond, USA
Tischzentrifuge	5412	Eppendorf, Hamburg, BRD
Tischzentrifuge	Labofuge II	Heraeus, Osterode, BRD
Durchlaufzentrifuge	KDD-605	Westphalia Separator, Oelde,BRD
Kühlzentrifuge	G 50 K	WKF, Darmstadt, BRD
Ultrazentrifuge	Airfuge	Beckmann Instr. München, BRD
Ultrazentrifuge	Mod. L5-65	Beckmann Instr. München, BRD

2.4 Methoden

2.4.1 Anzucht der Streptomycetenstämme

Die verwendeten Stämme wurden als lyophilisierte Sporen bezogen, in Wickerham Medium ausgesät und bei 30°C und 105 Upm im Rotationsschüttler angezogen. Mit diesen Kulturen wurde nun Schrägagar beimpft, 5 bis 15 Tage bei 30°C bis zur Sporulation inkubiert und anschließend bei +4°C aufbewahrt. Von dem Schrägagar wurden einzelne Kolonien mittels Impföse in autoklaviertes komplexes Medium als Vorkultur überführt und wie oben angezogen. Für die Schüttelkulturen wurden 100 ml Medium in 1-l Erlenmeyerkolben (4 Schikanen) autoklaviert. Angeimpft wurde mit Mycel aus wachsenden Komplexmediumkulturen (1 - 5 ml). Die Kolben wurden bei 30°C und 105 Upm auf dem Rotationsschüttler inkubiert.
Zur Gewinnung größerer Mycelmengen wurde 1 l Medium in 5-l Erlenmeyerkolben mit 100 ml entsprechender Vorkultur beimpft und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Diese Kulturen ihrerseits dienten auch als Vorkulturen für 20 l Fermentationen.
Zur Isolierung von Pentalenolacton bzw. Verbindungen, die Vorstufen oder Derivate des Pentalenolactons darstellen, wurde der Stamm S.arenae TÜ 469 im 200 l Maßstab in der Fermentationsabteilung des Biologischen Instituts der Universität Tübingen, sowie im 4000-l Maßstab bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig-Stöckheim angezogen.

2.4.2 Biochemische Bestimmungen

2.4.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung gereinigter oder teilweise gereinigter Enzyme wurde nach Lowry in einem modifizierten Verfahren durchgeführt (61).
Die Proteinbestimmung in Rohextrakten, Homogenaten und stark verdünnten Lösungen wurde nach Bradford (11) durchgeführt. Die Grenzen der Methode, sind unter (76) und (99) beschrieben. Des-

halb wurden grundsätzlich Proteinstandards mitgetestet. Außerdem wurden die Ergebnisse gelegentlich mit der Bestimmung nach Lowry verglichen.

Zur Gesamtprotein-Bestimmung von Kulturen wurden 10 ml Aliquots der geernteten Kultur entnommen, die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in 5 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7.0 suspendiert. Anschließend wurden 100 µl Lysozymlösung (1mg/ml) zugegeben und der Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 1 min mit Ultraschall behandelt, weitere 30 min inkubiert, auf 12 ml mit H_2O bidest. aufgefüllt und 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstands wurde anschließend nach Bradford bestimmt, wobei das Ergebnis um die Konzentration des eingesetzten Lysozyms korrigiert wurde.

2.4.2.2 Bestimmung der Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase

Die Aktivität der GAPDH wurde spektrophotometrisch in einem modifizierten Test nach Allison und Kaplan (1) bestimmt. Das Testgemisch (2.5 ml) enthielt außer der Enzymprobe 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 4 mM Mercaptoethanol, 4 mM EDTA, 2 mM NAD sowie 4mM Na_2HAsO_4. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 5mM Glyceraldehyd-phosphat gestartet.
Die Inaktivierung des Enzyms durch PL wurde bei Enzymen aus Streptomyces nach Zugabe von 10 mMol PL-Chlorhydrin (4µM) und einstündiger Inkubation im Testgemisch bestimmt. Beim Test in Rohextrakten konnte anhand der Inaktivierung einer Probe im Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollbestimmung der Gehalt an PL-sensitiver und PL-insensitiver GAPDH bestimmt werden, da unter den angegebener Testbedingungen 100% Inaktivierung bzw. 0 - 5% Inaktivierung von Streptomycetenenzymen beobachtet wurde (62).

2.4.2.3 Bestimmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase Aktivität

10 ml einer Kultur wurden steril entnommen, abzentrifugiert, wie unter 2.4.2.7 beschrieben gewaschen und in 125 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 100 mM KCl, 25% Glycerin, 1 mM EDTA, 10 mM Dithioerythrit suspendiert und mit Ultraschall (2 x 30 s) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Der Überstand einer anschließenden 5000 x g Zentrifugation (10 min) wurde in den Test eingesetzt.
Folgendes Testgemisch wurde pipettiert:

1 ml 125 mM Kaliumphosphatpuffer (s.o.)
+ 100 µl Rohextrakt
+ 20 µl 0.1 M NADP oder 40 µl 0.05 M NAD

Die Reaktion wurde nach 1 bis 5 min Inkubation bei RT durch Zugabe von 50 µl Glucose-6-phosphat (0.5 M) gestartet und der Anstieg der Extinktion bei 340 nm gegen einen Leerwert gemessen. Der Test nach Bergmeyer (6) erwies sich als ungeeignet, da die Substratkonzentrationen offensichtlich limitierend waren; außerdem war die Aktivität im angegebenen Puffer instabil.

2.4.2.4 Bestimmung der Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase Aktivität

Der Test wurde nach Shapiro (35) modifiziert (47) und beruht auf der chromatographischen Abtrennung und Auszählung von Mevalonsäure, die als Produkt der enzymatischen Reaktion aus ^{14}C-HMG-CoA gebildet wird.
Die Zellen einer steril entnommenen Probe wurden abzentrifugiert, mit 0.9% Kochsalzlösung gewaschen und in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 100 mM KCl, 25% Glycerin, 10 mM EDTA und 10 mM Dithioerythrit suspendiert. Der Aufschluß erfolgte durch 2 x 30 s Ultraschallbehandlung mit dem Branson sonifier unter Eiskühlung. Zelltrümmer und Mycel wurden in einer Kleinzentrifuge abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 -100 µl in den Test eingesetzt.

In ein Eppendorf-cup wurde folgender Testansatz pipettiert:

Glucose-6-phosphat 0.5 M	20 µl
NADP 0.1 M	10 µl
G6PDH aus Leuconostoc (2mg/ml)	10 µl
oder stattdessen:	
NADH 5 mM	40 µl
außerdem:	
Rinderserumalbumin (10mg/ml)	10 µl
Enzymprobe	60 - 180 µl
Kaliumphosphatpuffer	ad 230 µl

Der Ansatz wurde 20 min bei 30°C vorinkubiert und anschließend mit dem Substrat gestartet:

^{14}C-HMG-CoA 2nMol	5 µl
Kaliumphosphatpuffer	5 µl
HMG-CoA 20 nMol	10 µl

Die Inkubation des Tests erfolgte nach Überprüfung von Zeit- und Proteinabhängigkeit 20 min bei 30°C. Nach 19 min wurden dem Test 75 µl 1.0 M Mevalonsäurelacton sowie 25 µl 0.1 M Hydroxymethylglutarsäure zugegeben. Nach 20 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 6 M Schwefelsäure gestoppt und 20 min auf 50°C erwärmt, um die Umwandlung der Mevalonsäure in das Lacton zu beschleunigen.
Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert und zweimal 150 µl des Überstands in 50+40+30+20+10 µl Portionen auf eine DC-Platte (0.5 mm, Kieselgel 60) in einer 5cm breiten Bahn aufgetragen. Die Platte war zuvor 1 h bei 100°C aktiviert worden. Nachdem die DC-Platten an der Luft gründlich getrocknet worden waren, wurden sie in Benzol:Aceton 1:1 entwickelt und das Kieselgel in 0.5 cm Abschnitten in Szintillationsgefäße gekratzt und mit Triton-Toluol-Szintillator ausgezählt (siehe Abb. 6). Durch die Bedingungen der Chromatographie war das Mevalonsäurelacton wieder in die freie Säure umgewandelt worden, so daß die Radioaktivität und das eingesetzte Mevalonsäurelacton nur in der Bande freier Meva-

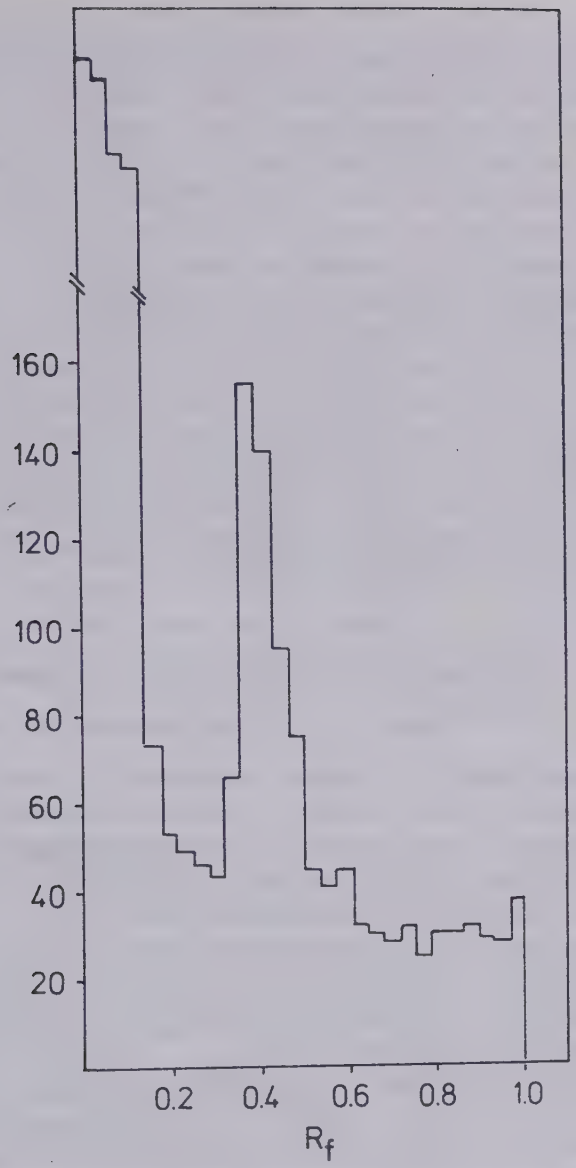


Abb. 6: Dünnschichtchromatographische Auftrennung des HMG-CoA Reduktase Testansatzes

Die Auftrennung erfolgte auf 0.5 mm Kieselgelplatten mit Benzol: Aceton 1:1 (Laufstrecke 13.5 cm). Die Bestimmung der Radioaktivität wurde in 0.5 cm-Abschnitten des Kieselgels durchgeführt.

lonsäure nachweisbar waren. Der Nachweis für eine derartige Umwandlung konnte auch mit analysenreinen Substanzen im nichtradioaktiven Test erbracht werden. Mevalonsäure wies im angegebenen Laufmittelsystem einen R_f-Wert von 0.35 auf, während das Lacton einen R_f-Wert von 0.53 besaß. Trotzdem war eine quantitative Abtrennung gebildeter Mevalonsäure möglich, wie aus der Abb. 6 hervorgeht. Der Nachweis von Mevalonsäure und ihrem Lacton efolgte nach (7) mit dem Bromkresolgrün-Bromphenolblau-Kaliumpermanganat-Sprühreagenz. Mevalonsäure erscheint hierbei als violetter Fleck, Mevalonsäurelacton mit blauer und Hydroxymethylglutarsäure mit rosaroter Farbe. Dadurch daß bei der Berechnung der unspezifische Untergrund gekochter Proben abgezogen wurde, war trotz der Mängel der Trennung eine genaue Bestimmung möglich.
Die Aktivität der HMG-CoA Reduktase wurde außerdem auch nach dem Verfahren von Edwards et al. bestimmt, wobei das Produkt über Ionenaustauscher abgetrennt wird (33).

2.4.2.5 Bestimmung der Isopentenylpyrophosphat Isomerase Aktivität

Das Enzym isomerisiert Isopentenylpyrophosphat zu Dimethylallylpyrophosphat. Dieses zeichnet sich wie auch die anderen Allylpyrophosphate beim Vergleich mit Isopentenylpyrophosphat (IPP) durch besondere Säurelabilität aus, so daß nach milder Säurehydrolyse die entstandenen Prenylalkohole leicht durch Extraktion vom eingesetzten IPP abgetrennt werden können (73).
Die Bestimmung bei pH 8.5 efolgte, um die Werte der gleichzeitig bestimmten Prenyltransferase-Aktivitäten um die Aktivität der IPP-Isomerase korrigieren zu können.
Je 10 ml Kultur wurden steril entnommen, abzentrifugiert und mit je 5 ml dest. Wasser, 1 M KCl und 0.8 M NaCl gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml Puffer suspendiert und 30 s ultrabeschallt. Als Puffer wurden jeweils 100 mM Tris/Cl pH 8.5, (3 mM $MgCl_2$, 5 mM L-Cystein, 10 mM Mercaptoäthanol) und 150 mM Natriumsuccinat pH 6.5 (NaOH), 20 mM Mercaptoäthanol verwendet. Das Homogenat wurde 15 min bei 5000 x g zentrifugiert und 500 µl

des Überstands als Rohextrakt in den Test eingesetzt.
In einem verschraubbaren Reagenzglas wurde folgendes Testgemisch pipettiert:

500 µl Rohextrakt (0.1 - 1 mg Protein) in Puffer
+500 µl Puffer
+ 25 nMol (1-^{14}C)-IPP (25 nCi)
+ 20 µl 1 M NaF

Der Ansatz wurde 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 0.2 ml 6 M HCl in 80% Äthanol zugegeben. Außerdem wurden je 1 mg Geraniol und Farnesol zugefügt und weitere 30 min bei 37°C hydrolysiert. Im weiteren wurden 0.4 ml 6 N NaOH zugegeben und nach Abkühlen mit je 3 ml n-Hexan extrahiert. Je 1 ml (2x) der Hexanphase wurde anschließend mit Toluol-Szintillator ausgezählt. Bei der Berechnung wird von Farnesylpyrophosphat (FPP) als Produkt der Reaktion in Rohextrakten ausgegangen, d.h. von der Reaktion des Produkts Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) mit zwei weiteren Molekülen IPP zu FPP unter dem Einfluß von Prenyltransferasen. Aus diesem Grund wurde die gemessene Aktivität durch 3 dividiert. Eine weitere Korrektur erfogte mit gekochten Rohextrakten sowie mit Testansätzen, die nicht hydrolisiert worden waren, um die Phosphatase-Aktivität zu bestimmen.

2.4.2.6 Bestimmung der Dimethylallyl-, Geranyl- und Terpenoid-allyltransferasen

Das Testprinzip ist mit dem in 2.4.2.5 beschriebenen identisch, ebenso die Vorbehandlung der Zellen. Der Test beruht im wesentlichen auf dem von Takahashi beschriebenen Verfahren (103). Der Aufschluß erfolgte im Gegensatz zur IPP-Isomerase-Bestimmung ausschließlich in Tris/HCl pH 8.5 (siehe 2.4.5.2). Das Testgemisch wurde ebenfalls in verschraubbare Reagenzgläser pipettiert:

500 µl Rohextrakt
+500 µl Puffer (Tris/HCl pH 8.5)
+ 25 µl IPP (1nMol/µl = 25 nCi)
+ 25 µl DMAPP oder GPP oder FPP (je 1 µMol/ml)
+ 20 µl NaF (1 M)

Die Inkubation wurde 60 min bei 30°C durchgeführt. Anschließend wurden je 1 mg Geraniol und Farnesol, sowie 0.2 ml 6 N HCl zugegeben. Nach 30 min Hydrolyse bei 37°C wurden 0.4 ml 6 N NaOH zugegeben und nach Abkühlen mit 3 ml n-Hexan extrahiert. Je 1 ml der Hexanphase wurde in Doppelbestimmungen in Toluol-Szintillator ausgezählt und aus der bestimmten Aktivität mit Hilfe der spezifischen Aktivität des eingesetzten IPP die Enzymaktivität in umgesetzten pMol/min/mg Protein bestimmt. Von den ermittelten Enzymaktivitäten wurde der Wert der im gleichen Rohextrakt bestimmten IPP-Isomerase-Aktivität subtrahiert.

2.4.2.7 Bestimmung der Farnesylpyrophosphat Zyklase

Der Test auf Farnesylpyrophosphat Zyklase-Aktivität erfolgte in modifizierter Form nach Cane und Tillman (17,18). Das Testprinzip beruht auf dünnschichtchromatographischer Trennung des ^{14}C-markierten Reaktionsprodukts Pentalenen.

Das Mycel aus 2 bis 6 100ml-Submerskulturen wurde abzentrifugiert und mit dest. Wasser, 1 M KCl und 0.9 M NaCl gewaschen, um Proteasen zu entfernen (52). Die Zellen wurden in 25 - 50 ml Inkubationspuffer (100 mM Tris/HCl pH 7.5, 0.4 mM Dithioerythrol, 1 mM EDTA und 5% Glycerin) suspendiert und im Zentrifugenglas unter Eiskühlung 3 x 30 s ultrabeschallt. Anschließend wurde das Homogenat 10 min bei 5000 x g zentrifugiert, der Überstand abgetrennt, 1 min mit Stickstoff begast und in den Test eingesetzt.

Das Testgemisch wurde wie folgt in 25 ml Erlenmeyerkölbchen pipettiert:

25 ml Rohextrakt (evtl. 1:1 mit Inkubationspuffer verd.)
+ 0.5 ml 10 mM $MgCl_2$
+ 3.0 ml 0.072 µM (1-^{14}C)-trans-trans-Farnesylpyrophosphat

Die Inkubation erfolgte bei 30°C über einen Zeitraum von 90 min.

Anschließend wurden 25 ml Aceton p.a. und 20 µl Pentalenenlösung (10 - 15 mg/ml Hexan) zugegeben. Das Gemisch wurde 3 x mit 50 ml n-Hexan extrahiert, wobei z.T. hartnäckige Emulsionen auftraten. Die Hexanphasen wurden vereinigt , über Nacht mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert, am Rotationsverdampfer eingeengt und in 1 ml n-Hexan wiederaufgenommen. Die Hexanlösung wurde auf 0.5 mm DC-Platten (Kieselgel 60 F_{254}) aufgetragen, die in 5 cm breite Bahnen aufgeteilt worden waren. Die Entwicklung der Dünnschichtchromatographie erfolgte in Hexan:Äthylacetat 9:1. Nach Trocknung der Platten wurden die Kieselgelschichten entweder in 0.5 cm- oder 1 cm-Abschnitten in Szintillationsgläschen transferriert. Alternativ wurde im Routinetest nur die Pentalenenbande anhand ihrer Fluoreszenzlöschung bei 254 nm detektiert und in einem Szintillationsgläschen vereinigt und mit 5 ml Toluol-Szintillator ausgezählt. Pentalenen, Humulen und andere Terpene besitzen im angegebenen Laufmittel einen R_f-Wert von 0.6 -0.7.
Die weitere Analyse der terpenoiden Reaktionsprodukte erfolgte nach Extraktion aus dem Kieselgel mit Toluol(Szintillator):$CHCl_3$ 1:4 auf DC-Platten (0.2 mm, Kieselgel 60, mit 15% $AgNO_3$ imprägniert und 1 h bei 100°C getrocknet), die in n-Hexan entwickelt wurden. Auch hierbei wurde die Kieselgelschicht nach Chromatographie in 1 cm-Abschnitten in Szintillationsgläschen überführt und mit Toluol-Szintillator ausgezählt. Zur Kontrolle wurden Leerwerte mit Puffer bzw. mit gekochtem Rohextrakt getestet und die Meßergebnisse entsprechend korrigiert.

Bestimmung der Farnesylpyrophosphat Zyklase in vereinfachter Form

Um den Test auf FPP-Zyklase-Aktivität auch mit handelsüblichen Chemikalien durchführen zu können, wurde ein vereinfachtes Testverfahren entwickelt, das auf der im Verhältnis zur FPP-Zyklase weit höheren Aktivität der Prenyltransferasen beruht (siehe Ergebnisse). Bei Testen in Rohextrakten wurde als Substrat (1-^{14}C)IPP verwendet, das durch die enzymatischen Aktivtäten im Rohextrakt zu Farnesylpyrophosphat umgewandelt wird. Da im Routinetest aufgrund der Ergebnisse nur eine Trennung über Dünnschichtchromatographie im System Hexan:Äthylacetat 9:1 notwendig

war, war es außerdem möglich, mit 10 mg Humulen als kaltem Träger zu arbeiten. Daraus folgte für den vereinfachten Test mit Rohextrakten folgendes Pipettierschema:

25 ml Rohextrakt in Inkubationspuffer
0.5 ml $MgCl_2$ (10 mM)
75 µl (1-^{14}C) IPP (Amersham 1µMol ^{14}C-IPP/ml)
225 µl IPP (86 µMol/ml)

Die Inkubation erfolgte 90 min bei 30°C. Anschließend wurden 10 µl Humulen und 25 ml Aceton zugefügt und mit 3 x 50 ml n-Hexan extrahiert. Der weitere Testablauf war identisch mit dem beschriebenen Test. Nur auf die Chromatographie an Silbernitrat-imprägnierten Kieselgelschichten wurde verzichtet.

2.4.2.8 Weitere enzymatische Bestimmungen

Die Aktivität der Leucin Dehydrogenase wurde nach (90) bestimmt. Die Aktivität der Glutamat Dehydrogenase wurde geringfügig verändert nach Bergmeyer gemessen (6). Die Konzentration von Mannit wurde mit Mannit Dehydrogenase nach der Methode von Bergmeyer (6) bestimmt. Die hierfür notwendige Mannit Dehydrogenase wurde , wie in 2.4.8.3 beschrieben, aus S.arenae TÜ 469 angereichert.

2.4.2.9 Bestimmung des ATP-Gehalts

Der ATP-Gehalt der Zellen wurde mit einem Biolumineszenztest auf der Grundlage der Luciferin/Luciferase-Reaktion bestimmt.
Aus einem Aliquot der Kultur wurde das Mycel abzentrifugiert und in 3 ml 50 mM Tris/HCl pH 8.0 durch schwache Behandlung mit Ultraschall während 15 s suspendiert. Das ATP wurde aus den Zellen durch Zugabe eines gleichen Volumens NRB-Reagenz (Lumac) während 2 min extrahiert. Danach wurde der Ansatz auf 10 ml mit Tris-Puffer aufgefüllt, abzentrifugiert (1 min) und 100 µl des Überstands der Extraktion (z.T. in entsprechender Verdünnung) mit 100 µl des nach Herstellerangaben angesetzten Testgemischs (ATP Biolumineszenz CLS, Boehringer, Mannheim) im Luminometer gemischt

und die ATP-Konzentration aus der relativen Lichtintensität über eine Eichkurve bestimmt. Die Messung erfolgte in allen Fällen 5 min nach Probenentnahme und wurde auf störende ATPase-Aktivität überprüft.

2.4.2.10 Bestimmung der Pentalenolacton-Konzentration

Die quantitative Bestimmung von PL beruht auf der nach Zdunek (117) stöchiometrischen Inaktivierung von GAPDH aus Kaninchenmuskel und wurde in dem angegebenen Verfahren durchgeführt.
In den GAPDH-Test nach 2.4.2.2 mit 50 mM Natriumpyrophsphatpuffer pH 8.5 und 13 mU GAPDH aus Kaninchenmuskel (i.a. 20 µl einer 1:400 Verdünnung des handelsüblichen Präparats) wurde die zu bestimmende PL-Lösung in solcher Menge zugegeben, daß nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur eine 40 - 60% Inaktivierung des Testenzyms resultierte. Über eine Eichkurve konnte damit die PL-Konzentration bestimmt werden.

2.4.2.11 Bestimmung der Myceltrockengewichte

Zur Bestimmung des Trockengewichts der Zellen während des Verlaufs von Fermentationen und Schüttelkulturen wurden 20 bzw. 10 ml Aliquots steril entnommen und in austarierten Zentrifugengläsern abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit gesättigter EDTA-Lösung und mit entionisiertem Wasser je zweimal gewaschen. Anschließend wurden sie 24 h bei 100°C getrocknet, im Exsikkator 1 h auf Raumtemperatur abgekühlt und gewogen.

2.4.2.12 Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen

Der Gehalt an DNA wurde nach einer Methode von Richards (80) bestimmt. Hierfür wurde ein Aliquot einer Kultur entnommen, die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Tris-Puffer mit Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen (siehe 2.4.2.1) und mit 5 ml Äthanol

15 min bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf +4°C abgekühlt und bei dieser Temperatur 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 0.2 M eiskalter $HClO_4$ gewaschen, anschließend in 1 N NaOH aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nachdem der Ansatz wieder in Eis abgekühlt worden war, wurde mit 5 M $HClO_4$ auf eine Konzentration von ungefähr 0.2 M $HClO_4$ angesäuert, zentrifugiert und nochmals mit 0.2 M $HClO_4$ gewaschen. Der Niederschlag wurde in 0.5 M $HClO_4$ aufgenommen und 30 min bei 70°C extrahiert. Nach Abkühlen wurde wieder 10 min bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand zur DNA-Bestimmung eingesetzt.
1 ml Überstand wurde mit 2 ml Diphenylaminreagenz (1.5 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig + 1.5 ml H_2SO_4 konz. + 0.5 ml Acetaldehyd-Lösung (19 mg/ml)) gemischt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Messung erfolgte bei 600 nm im Vergleich mit Standardlösungen gegen einen Leerwert.

2.4.3 Messung der Radioaktivität

Bei radioaktiven Proben, die in organischen Lösungsmitteln gelöst waren, wurde die Probe oder ein Aliquot davon mit 5 ml Toluol-Szintillator versetzt und im Liquid-Szintillation Counter gemessen. Der Toluol-Szintillator bestand aus 10 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 250 mg POPOP (2,2'-Phenylen-bis(5-phenyloxazol)) in 2,5 l Toluol gelöst.
Bei wässrigen radioaktiven HPLC-Eluaten und bei der Bestimmung der HMG-COA Reduktase-Aktivität wurde ein Szintillationsgemisch aus 7 Teilen Toluol-Szintillator und 3 Teilen Triton X-100 verwendet. Maximal 0.5 ml wässrige Probe wurde mit 5 ml Szintillationsgemisch versetzt und nach Abklingen eventuell vorhandener Fluoreszenz ausgezählt. Die Zählausbeute wurde mit Hilfe eines ^{14}C-Toluol-Standards bestimmt. Bei Aktivitätslöschung infolge der Verwendung von Anfärbereagenzien wurde die Löschung auch über einen externen Standard oder die Kanalverhältnismethode bestimmt.

2.4.4 Analytische Trennmethoden

2.4.4.1 Analytische HPLC

Präparationen von Petalenolacton sowie Chloroformextrakte von Kulturfiltraten wurden über ein "Reversed Phase" HPLC-System mit einem sauren Eluenten chromatographiert.

Säulendimension:		250 x 4.6 mm
Füllmaterial/Partikelgröße:		Lichrosorb RP 18, 10 µm
Eluent:	System 1:	Methanol:Wasser 1:1, pH 2.7
		Der pH wurde mit 10 ml H_3PO_4 konz
		und 10 ml 10 M KOH pro l eingestellt
	System 2:	Methanol:Wasser 1:2 pH 2.7 s.o.
Flußrate:		1.0 ml/min
Detektion:		220 nm

Nach Zdunek (117) besitzten die bisher aus S.arenae TÜ 469 isolierten Pentalenolactonderivate folgende Retentionszeiten auf dem angegebenen Chromatographiesystem 1:

Pentalenolacton H-Diol:	11 min
Pentalenolacton F-Diol:	13 min
Pentalenolacton:	24 min
Pentalenolacton-Chlorhydrin:	29 min

Bei der Präparation von PL-Derivaten über HPLC zeigten sich häufig Verschiebungen dieser Retentionszeiten zu höheren Werten. Das PL-Chlorhydrin z.B. wurde im präparativen Verfahren zwischen 33 und 37 min eluiert.

Außerdem wurde ein HPLC-Analysenverfahren für GAPDH-Isoenzyme durch Auftrennung an einer DEAE-Säule getestet. Die Elution erfolgte hierbei mit einem Gradienten von 10 - 200 mM Kaliumphosphatpuffer. Die Detektion wurde nach Zumischung eines gleichen Volumens Substratgemisch nach der Säule und Durchlauf einer Reaktionsschleife (Dauer 1 min) in einem Fluoreszenzdetektor möglich.

Säulendimension:	250 x 2.5 mm
Füllmaterial/Partikelgröße:	Servachrom Si 100 Polyol DEAE
Eluent:	10 - 200 mM Kaliumphosphatpuffer
Flußrate:	1.0 ml/min
Temperatur:	25°C

Detektion: nach Zumischen der Substratlösung (Endkonzentrationen siehe GAPDH-Test 2.4.2.2) und Durchlaufen einer Reaktionsschleife erfolgte die Detektion im Fluoreszenzdetektor bei 470 nm nach Anregung bei 340 nm.

2.4.4.2 Gaschromatographie

Zur Untersuchung von Extrakten aus Zellen und Kulturfiltraten von S.arenae TÜ 469 auf ihren Gehalt an Pentalenen und zur Analyse von synthetisch hergestelltem Pentalenen wurde das folgende gaschromatographische System verwendet:

Säulentyp:		Kapillarsäule SE 30
Säulendimension:		25 mm I.D. x 25 000 mm
Temperatur-Injektor:		275°C
Temperatur-Säule:		140°C
Durchfluß:		60 ml
Gasdrücke:	Carrier:	0.4 kg/cm^2
	Wasserstoff:	0.6 kg/cm^2
	synth.Luft:	0.65 kg/cm^2

Humulen wurde unter diesen Bedingungen 22.8 min und Pentalenen 14.7 min nach Injektion mit Hilfe des FID-Detektors nachgewiesen.

2.4.4.3 Elektrophoretische Methoden

Zur Analyse der gereinigten Isoenzyme der GAPDH und ihrer Proteolyseansätze wurde ein SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-System benutzt.

Stammlösungen:

Lösung A: 30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid
Lösung B: 0.25 M Tris/HCl Puffer, pH 6.8
Lösung C: 0.75 M Tris/HCl Puffer, pH 8.8
Lösung D: 50% Glycerin in Lösung C

Sammelgel: (4.5%)

5.0 ml Lsg.B
1.5 ml Lsg.A
3.5 ml Wasser
100 µl 10% SDS-Lösung
10 µl TEMED
10 mg Kaliumperoxodisulfat

Trenngel: (15%)

7.5 ml Lsg.A
2.5 ml Lsg.B
5.0 ml Lsg.D
150 µl 10% SDS-Lsg.
3 µl TEMED
8 mg Kaliumperoxodisulfat

Elektrophoresepuffer: 15 g Glycin + 3.1 g Tris + 1 g SDS in 1 l H_2O, pH 8.3

Bedingungen: Die Proteinanfärbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue. Außerdem wurden zur Analyse der GAPDH auch Elektrophoresen unter nativen Bedingungen durchgeführt (Verfahren siehe Zdunek(117)). Hierbei wurde das Gel anschließend zerschnitten, mit GAPDH-Testmischung versetzt und der Überstand nach 45 min im Fluoreszenzphotometer gemessen. Die GAPDH-Isoenzyme waren unter den Elektrophoresebedingungen jedoch instabil.

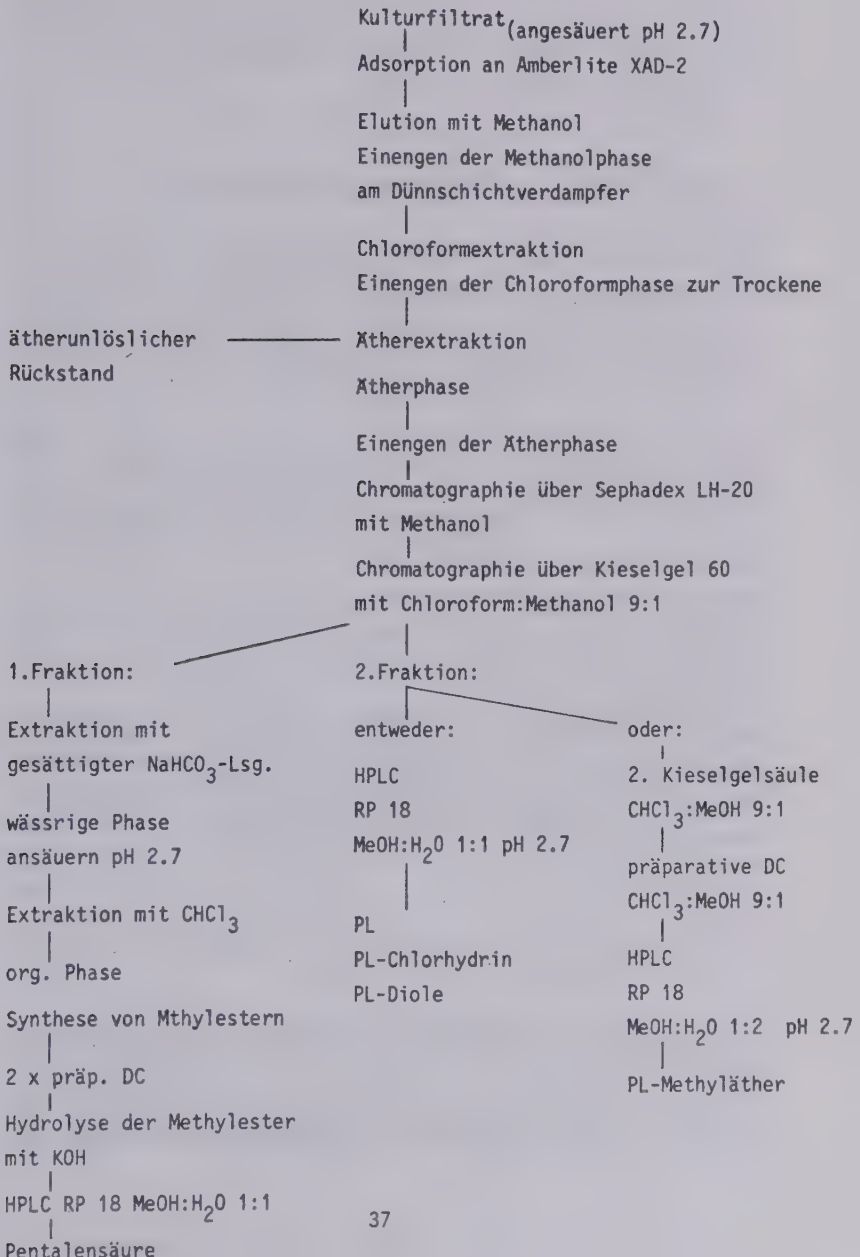
2.4.5 Isolierung von Pentalenolacton, Vorstufen und Derivaten

2.4.5.1 Isolierung von Pentalenolactonen

Die Isolierung von Pentalenolactonen erfolgte in Abwandlung der von Zdunek (116) beschriebenen Methode. Der PL-Nachweis erfolgte mit dem unter 2.4.2.10 beschriebenen Testverfahren.

In Abb. 7 ist das Aufarbeitungsschema für die Pentalenolactonverbindungen dargestellt. Das Verfahren wurde in dieser Form für die Aufarbeitung von 200 bis 4000 l Fermentationen durchgeführt.
Nach Ansäuern des Kulturfiltrats auf pH 2.7 mit Phosphorsäure erfolgte die Adsorption lipophiler Substanzen an Amberlite XAD-2 entweder über Säulen- oder "Batch"-Verfahren. Das Harz wurde mit Wasser gewaschen und mit Methanol eluiert. Die Methanolphase wurde am Dünnschichtverdampfer eingeengt und das dabei entstehende Methanol-Wasser-Substanz-Gemisch mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde am Rotationsverdampfer bis auf ein zähflüssiges, braunes Öl eingeengt. Dieses Öl wurde anschließend als dünner Faden in 1 - 2 l kräftig gerührten Diäthyläther getropft. Die Suspension wurde 24 h bei +4°C gerührt und anschliessend das ungelöste, gelbe Pulver abfiltriert. Die gelbe Ätherphase wurde über Nacht mit Natriumsulfat getrocknet und der Äther am Rotationsverdampfer abgezogen. Der gelbe, ölige Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen und über eine Sephadex LH-20 Säule (2 x 95 cm) mit Methanol chromatographiert. Hierbei konnte eine enzymatisch inaktive, rotgefärbte Substanz abgetrennt werden. Die hemmaktiven Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockene einrotiert. Nach längerem Evakuieren schäumte das gelbe Öl blasig auf und wurde fest. Das erhaltene Pulver wurde in wenig Chloroform aufgenommen und in 3 Portionen auf einer Kieselgelsäule (2 x 50 cm) mit Chloroform:Methanol 9:1 chromatographiert. Die hemmaktiven Fraktionen wurden vereinigt und zur Trockene einrotiert.

Abb.7 : Aufarbeitungsschema für die Isolierung von Pentalenolacton und verwandten Verbindungen aus dem Kulturfiltrat von S.arenae TO 469 Fermenterkulturen



Jeweils 1g des erhaltenen Pulvers wurden in 2 ml Methanol gelöst und über präparative HPLC an Lichrosorb RP 18 (Säulendimensionen 16 x 250 mm; Eluent: Methanol:Wasser 1:1, pH 2,7; Fluß 5.5 ml/min) chromatographiert. Die PL-hemmaktiven Fraktionen eluierten hierbei mit etwas längeren Retentionszeiten als bei der vergleichbaren analytischen Säule.

2.4.5.2 Isolierung des Pentalenolactonmethyläthers

Die Isolierung des PL-Methyläthers verlief bis zur Elution von der Kieselgelsäule identisch mit der Reinigung von Pentalenolacton. Die Reinigung der Substanz wurde über hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPTLC) und Anfärbung mit Dimethylaminobenzaldehyd analytisch verfolgt.

Nach der Elution von der Kieselgelsäule wurde die Substanz durch zweimalige präparative Dünnschichtchromatographie in Chloroform:Methanol 9:1 gereinigt (R_f-Wert = 0.34 - 0.37). Die weitere Reinigung erfolgte über HPLC (präp. Säule, Lichrosorb RP 18, siehe 2.4.5.2) mit Methanol:Wasser 1:2 als Eluent. Die Substanz wurde hierbei mit einer Retentionszeit zwischen 18 und 22 min von der Säule eluiert. Mit Methanol:Wasser 1:1 als Eluent erfolgt die Elution nach 6 - 11 min.
Mehrmals zersetzte sich die Substanz bei der Reinigung über HPLC bzw. bei der anschließenden Extraktion und Trocknung. Anstelle der vorher einheitlichen Substanz bei HPLC- oder HPTLC- Analyse waren dann wieder mehrere Substanzen nachzuweisen.

2.4.5.3 Isolierung der Pentalensäure

Die Isolierung der Pentalensäure erfolgte in Kombination der Methoden, die von Cane et al. (15) für die Isolierung von Pentalensäure und von Zdunek (117) für PL beschrieben wurden. Die Darstellung der Methylester erfolgte nach Fales (36) durch Um-

setzung der freien Säuren mit Diazomethan. Die Hydrolyse der Methylester wurde nach Sakai et al. (88) durchgeführt.

Pentalensäure konnte bei Chromatographie der ätherlöslichen Substanzen aus dem Kulturfiltrat von S.arenae TÜ 469 aus den ersten Fraktionen isoliert werden, die mit Chloroform:Methanol 9:1 von der Kieselgelsäule eluiert wurden (siehe 2.4.5.1). Entsprechende Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt, in Diäthyläther:THF 1:1 aufgenommen und mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde sofort auf pH 2.7 angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert, einrotiert, das Öl mit 2 ml getrocknetem Äther versetzt und soviel THF zugegeben, bis vollständige Lösung erfolgte. Diese Lösung wurde zur Methylestersynthese eingesetzt. Die Umsetzung erfolgte während 60 min bei 30°C, nachdem zuvor 45 min bei 0°C aus MNNG mit KOH das Diazomethan freigesetzt worden war. Anschließend wurden 2 ml ätherische Essigsäure zugegeben und zweimal mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und einmal mit gesättigter Kochsalzlösung extrahiert. Die Ätherphase wurde über Natriumsulfat getrocknet.

Die gebildeten Methylester wurden auf präparativer DC (Kieselgel 60, 2 mm) mit Benzol:Äthylacetat 3:1 aufgetrennt und in 4 Fraktionen mit Äthylacetat vom Kieselgel eluiert. Die Äthylacetatphasen wurden nach Zentrifugation abgetrennt, am Rotationsverdampfer eingeengt, der Rückstand in jeweils 500 µl Methanol aufgenommen und mittels analytischer HPLC analysiert. Da die Trennung noch unbefriedigend war, wurde eine weitere präparative DC (0.5 mm Kieselgel 60, 5 cm breite Bahnen) der vereinigten Fraktionen in Benzol:Äthylacetat 2:1 entwickelt. Die Banden wurden anhand der Fluoreszenzlöschung detektiert und mit 4 ml Methanol vom Kieselgel eluiert. Das Methanol wurde abgezogen, die Proben getrocknet und ausgewogen.
Aus einer Fraktion der Elution von der Kieselgelsäule bei der PL-Reinigung konnte auf diese Weise 1.0 mg Pentalensäuremethylester gewonnen werden.
Nach Bestimmung der Hemmaktivität im GAPDH-Test wurden 100 µl der

methanolischen Methylesterlösung mit 100 µl 3 N KOH versetzt und 3 h bei 40°C inkubiert. Die Bestimmung der Hemmaktivität erbrachte eine weitere Bestätigung der Identität der Substanz, da bei allen Pentalenolactonmethylestern unter diesen Bedingungen auch hydrolytische Spaltung des Lactonrings und dadurch weitgehender Verlust der GAPDH-Hemmaktivität erfolgt (117). Die freie Pentalensäure wurde bei pH 2.7 mit Chloroform extrahiert und über DC und HPLC analysiert.
Der isolierte Pentalensäuremethylester zeigte bei dünnschichtchromatographischer Analyse im System Benzol:Äthylacetat 2:1 einen R_f-Wert von 0.5 - 0.6 im Vergleich mit einem Literaturwert von 0.58 bzw.0.38-0.44 (15). Im System Benzol:Äthylacetat 3:1 lief die Substanz mit einem R_f-Wert von 0.40 - 0.50, verglichen mit dem Literaturwert von 0.48 (92). Die Retentionszeiten auf der analytischen HPLC betrugen (mit Methanol:Wasser 1:1 als Eluenten) 37.5 min für den Methylester und 26.5 min für die freie Säure. Die freie Säure lief in der DC-Analyse in Chloroform:Methanol 9:1 mit einem R_f-Wert von 0.70.

2.4.5.4 Versuche zur Isolierung von Pentalenen aus dem Kulturfiltrat und aus Zellen von S.arenae TÜ 469

Da Pentalenen dem Farnesylpyrophosphat Zyklase Test als kalter Träger zugesetzt werden sollte, wurde versucht, diese Substanz aus Kulturfiltrat oder aus Zellextrakten zu isolieren. Zur Analytik diente hierbei zunächst das von Cane und Tillman beschriebene Verfahren zur Analyse und Reinigung von Pentalenen an Silbernitrat-imprägniertem Kieselgel (18). Die Detektion erfolgte hierbei nach Anfärbung mit Antimon(III)chlorid.
Getestet wurden konzentrierte Kulturfiltrate und ein nach Seto et al. (93) mit 60% Aceton gewonnener Extrakt aus den Zellen einer 200 l Fermentation.
Nachdem im dünnschichtchromatographischen Test kein Pentalenen nachgewiesen werden konnte, wurde der gaschromatographische Nachweis von Pentalenen versucht. Hierbei gelang es, Pentalenen im Aceton-Extrakt eindeutig nachzuweisen. Allerdings waren die de-

tektierten Mengen so gering, daß eine Isolierung von Petalenen aus dem Aceton-Extrakt als nicht sinnvoll angesehen werden mußte. Statt dessen wurde versucht, die Substanz in einem synthetischen Verfahren aus Humulen zu gewinnen.

2.4.6 Synthesen und chemische Umsetzungen

2.4.6.1 Synthese von Isopentenylpyrophosphat

Die Synthese von Isopentenylpyrophosphat erfolgte nach der von Cornforth und Popjak (23) beschriebenen Methode. Das Prinzip der Synthese beruht auf der Umsetzung des Isopentenylalkohols mit Phosphorylchlorid und Pyridin und anschließender Hydrolyse zum Monophosphorsäureester. Isopentenylphosphoromorpholidat wird mit getrocknetem tri-n-Butylammoniumphosphat umgesetzt und anschließend mit Lithiumhydroxid in Trilithiumisopentenylpyrophosphat überführt.

Synthese von Dilithium-Isopentenylphosphat

Frisch destilliertes $POCl_3$ (4.1 ml, 45 mMol) und trockener Äther p.a. (6 ml) wurden auf -10°C - -15°C abgekühlt. 3 ml 3-Methyl-(3)buten(1)ol (30 mMol, 2.58 g), 3.63 ml (45 mMol) getrocknetes Pyridin und 6 ml getrockneter Äther wurden im Tropftrichter gemischt und während 30 bis 45 min zur gekühlten $POCl_3$-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde für 20 h bei -20°C aufbewahrt. Das entstandene Gemisch wurde über eine Nutsche filtriert, das Filtrat wurde in 10 g Eis aufgefangen, der Kolben und der Filter wurden mit Äther nachgespült und das Filtrat mit 4.32 g LiOH in 50 ml Wasser versetzt. Der Äther wurde am Rotationsverdampfer abgezogen und der pH mit wenig NH_3 auf 12 eingestellt.
Der Niederschlag von Trilithiumphosphat wurde abzentrifugiert und mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt, mit HCl auf pH 8 eingestellt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in Äthanol:Äther 1:2 suspendiert und abzentrifugiert. Das unlösliche Dilithiumisopentenylmonophosphat wurde

einmal mit Äthanol:Äther 1:2 und zweimal mit Äther gewaschen und zuletzt über P_2O_5 getrocknet.
Ausbeute: 2.2 g (= 81% d.Lit.)

Synthese von Isopentenylphosphoromorpholidat und Trilithium-isopentenylpyrophosphat

890 mg (5 mMol) Dilithiumisopentenylmonophosphat wurden in 10 ml Wasser gelöst und auf eine Dowex-Säule (1 x 5 cm, H-Form) gegeben. Das Isopentenylmonophosphat wurde anschließend mit 50 ml Wasser von der Säule eluiert. Zu diesen 50 ml wurden 50 ml tert. Butanol und 1.7 ml Morpholin (20 mMol) gegeben. Die Mischung wurde anschließend in einem Dreihalskolben vorsichtig am Rückfluß zum Sieden erhitzt. 4.12 g Cyclohexylcarbodiimid (20 mMol) wurden in 20 ml tert. Butanol gelöst und während 1 h zu der Mischung zugetropft, anschließend während 4 h am Rückfluß gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und mit tert. Butanol nachgespült. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer konzentriert, mit Äther extrahiert und die wässrige Phase durch mehrmaliges Abdestillieren von Methanol und Äther zur Trockene einrotiert. Der gelbe Rückstand von Isopentenylphosphoromorpholidat wurde durch Abziehen von zweimal 20 ml Pyridin (über CaH_2 getrocknet) vollständig getrocknet.

Das Phosphorylierungsreagenz wurde durch Mischen von 1.02 ml 88% o-Phosphorsäure (15 mMol) und 3.6 ml tri-n-Butylamin (15 mMol) in getrocknetem Pyridin hergestellt. Die weitere Trocknung erfolgte durch mehrmaliges Abziehen von getrocknetem Pyridin.
Butylammoniumphosphat und Isopentenylphosphoromorpholidat wurden in 10 ml Pyridin gemischt, das Pyridin abgezogen und der getrocknete Rückstand erneut in Pyridin gelöst. Nach zwei Tagen bei 26°C wurde das Pyridin abdestilliert, der gummiartige Rückstand in Wasser aufgenommen, mit LiOH auf pH 12 gebracht und mit Äther extrahiert. Die entstehende Emulsion wurde durch Zentrifugation gebrochen, es bildeten sich 4 Schichten: ein Präzipitat aus Trilithiumphoshat, eine wässrige Phase, ein Interphasepräzipitat

und die Ätherphase. Die Ätherphase wurde verworfen, die Niederschläge mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen, die wässrigen Phasen vereinigt und zur Trockene einrotiert. Der feste Rückstand wurde mit Äthanol:Äther 1:2 gründlich extrahiert, das unlösliche Trilithiumisopentenylpyrophsophat wurde durch Zentrifugation wiedergewonnen, mit Äther gewaschen und über P_2O_5 getrocknet.

Verunreinigungen von Isopentenylmonophosphat wurden durch Chromatographie an Kieselgel 60 (2 x 25 cm) mit n-Propanol:Ammoniak: Wasser 6:3:1 entfernt. IPP wurde mit einem Elutionsvolumen von 100 -150 ml von der Säule eluiert, die Elution wurde durch dünnschichtchromatographische Analyse überprüft (0.2 mm Kieselgel 60, Laufmittel: n-Propanol:Ammoniak:Wasser 6:3:1, Anfärbung mit dem Reagenz nach Hanes und Isherwod (Stahl (100))).

Die Ausbeute an IPP betrug 0.52 g (=41% d.Lit.)

2.4.6.2 Synthese von Dimethylallylpyrophosphat

Die Synthese beruht auf der Methode von Cornforth und Popjak (23). Das Prinzip der Synthese besteht in der zweimaligen Umsetzung des Alkohols mit Phosphorsäure und Trichloracetonitril unter Bildung zuerst des Monophosphats und anschließend des Pyrophosphats.
Aus einem Gemisch von 20 g H_3PO_4 in 100 ml Acetonitril und 41.3 g Triäthylamin kristallisierte bei +4°C Di-triäthylammoniumphosphat aus.
Zu 10 mMol 3-Methyl(2)buten(1)ol (867 mg) wurden 6 mMol Trichloracetonitril (864 mg) in einen Zweihalskolben gegeben. 7 g Ditriäthylammoniumphosphat wurden in 50 ml Acetonitril unter Erwärmen gelöst und langsam während 3 - 4 h dem Gemisch zugetropft. Anschließend wurde der Ansatz 2 h bei Raumtemperatur stehengelassen, mit 100 ml Äther verdünnt und dreimal mit je 30 ml 0.1 N NH_3 extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und dreimal mit 50 - 100 ml Äther extrahiert. Die entstehenden Emulsionen wurden durch Zentrifugation getrennt, die wässrigen Phasen wurden ver-

einigt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Gemisch aus Mono- und Pyrophosphat wurde durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 2 x 25 cm, Eluent: Propanol:NH_3:H_2O 6:3:1) aufgetrennt, das Monophosphat eluierte nach 25 bis 75 ml, das Pyrophosphat zwischen 100 und 150 ml. Die entsprechenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer konzentriert, mit Äther gefällt und getrocknet.
Ausbeute: 500 mg (= 17% d.Lit.)

2.4.6.3 Synthese von Geranylpyrophosphat

Zur Synthese von GPP wurde das Verfahren von Plieninger und Immel (77) zur Pyrophosphorylierung von Isopentenol verwendet, das im wesentlichen mit dem unter 2.4.6.2 beschriebenen Reaktionsprinzip übereinstimmt.
Eine Lösung von 1.13 g (10 mMol) 85% o-Phosphorsäure in 10 ml Acetonitril wurde mit 2.0 g (20 mMol) Triäthylamin geschüttelt, bis der Niederschlag sich gelöst hatte. Diese Lösung wurde bei Raumtemperatur im Verlauf von 3 h zu einer kräftig gerührten Mischung von 2.7 ml (20 mMol) Geraniol und 4.3 g (30 mMol) Trichloracetonitril getropft. Nach Rühren über Nacht wurde mit Aceton auf 100 ml verdünnt, mit 7.5 ml Cyclohexylamin versetzt und gekühlt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Aceton und Äther gewaschen. Die Reinigung erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel 60 (2 x 25 cm-Säule, Eluent: Propanol:Ammoniak:Wasser 6:3:1). Die Fraktionen, die das Pyrophosphat enthielten, wurden eingeengt und in Aceton:Wasser 1:1 auskristallisiert.
Ausbeute: 1.18 g (2.9 mMol)

2.4.6.4 Synthese von Farnesylpyrophosphat

Das Prinzip der Pyrophosphorylierung war auch hierbei mit dem unter 2.4.6.2 beschriebenen Verfahren identisch. Dagegen erfolgt die Auftrennung der Reaktionsprodukte aufgrund der besonderen

Eigenschaften des Farnesylpyrophosphats. Die Synthese beruht auf einer nach Cornforth und Popjak (23) modifizierten Methode.

5 mMol Farnesol (Isomerengemisch) und 4.5 ml Trichloracetonitril wurden gemischt. 45 mMol di-Triäthylammoniumphosphat (siehe unter 2.4.6.2) in 50 ml Acetonitril wurden während 3 - 4 h zugetropft. Das Gemisch reagierte anschließend 24 h bei Raumtemperatur. Danach wurde mit 100 ml Äther verdünnt und dreimal mit 30 ml 0.1 M wässrigem Ammoniak extraiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden auf 20 - 40 ml am Rotationsverdampfer eingeengt, 100 ml 0.01 M NH_4OH und 20 g entgastes XAD-2 zugegeben, und über Nacht geschüttelt. Das Harz wurde über eine Glasfritte abgetrennt und mit 50 ml 0.01 M NH_4OH gewaschen. Die Elution des FPP von XAD-2 erfolgte mit 4 x 10 ml Methanol (0.01 M an NH_3). Die vereinigten Methanolphasen wurden am Rotationsverdampfer auf 2 - 5 ml konzentriert und der Rückstand auf eine DEAE-Cellulose-Säule (2 x 10 cm) gegeben, die in Methanol (0.08 M an Ammoniumformiat) äquilibriert war. Das FPP wurde mit dem gleichen Eluenten von der Säule eluiert (Elutionsvolumen 80 - 300 ml). Die FPP-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert, bis das Ammoniumformiat auszukristallisieren begann. Daraufhin wurde 0.01 M NH_3 zugegeben und wieder konzentriert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis alles Methanol entfernt war. Die schwach alkalische wässrige Lösung des FPP wurde wieder mit XAD-2 behandelt, das XAD-2 nach 24 h Schütteln abgetrennt und FPP mit Methanol (0.01 M NH_3) eluiert. Das Methanol wurde einrotiert und der Rückstand getrocknet. Nach Auswaage wurde das Farnesylpyrophosphat als Lösung in Tris/HCl pH 8.0 bei -20°C aufbewahrt.
Ausbeute: 300 mg

2.4.6.5 Enzymatische Synthese von (1-^{14}C)-trans-trans-Farnesylpyrophosphat

Zum Test der Farnesylpyrophosphat Zyklase wurde ^{14}C-markiertes trans-trans Farnesylpyrophosphat benötigt. Für tt-FPP sind chemische Synthesen bei Cane (14) und enzymatische Synthesen bei

Cornforth und Popjak (23) beschrieben worden. Die Synthese wurde ausgehend von ^{14}C-IPP nach (23) mit einer Proteinfraktion aus dem Überstand einer 100 000 x g Zentrifugation von Rattenleberhomogenat durchgeführt (siehe 2.4.8.4)

Es wurde folgender Inkubationsansatz pipettiert:

7.5 ml dialysierte Proteinlösung aus dem 100 000 g Überstand
+7.5 ml 0.1 M Tris/HCl pH 7.9 (5 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 30 mM Cystein-HCl)
+ 30 µMol IPP (29.9 µMol IPP + 141 nMol ^{14}C-IPP (7.5 µCi)
+ 30 µMol GPP

Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37°C. Anschließend wurden 30 ml Äthanol zugegeben und der Ansatz 5 min auf 60°C erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurden die ausgefallenen Proteine 10 min bei 3000 x g abzentrifugiert und der Niederschlag dreimal mit 80% Äthanol gewaschen. Die vereinigten äthanolischen Lösungen wurden bei 35°C am Rotationsverdampfer auf ein Volumen von 10 ml eingeengt. 50% der eingesetzten Radioaktivität befand sich in der äthanolischen Lösung, die mit 50 ml 0.01 M NH_4OH, 5 ml 0.25 M EDTA sowie 7.5 g XAD-2 versetzt und über Nacht geschüttelt wurde. Das Harz wurde anschließend über eine Glasfritte abgetrennt, mit 50 ml 0.01 M NH_4OH gewaschen und mit 4 x 10 ml und 2 x 30 ml Methanol (0.01 M NH_3) eluiert. Die Aktivität aller Fraktionen wurde bestimmt, die methanolischen Fraktionen wurden vereinigt, am Rotataionsverdampfer konzentriert und bei -20°C aufbewahrt. Das wässrige, eingeengte XAD-2 Eluat enthielt 2.4 x 10^6 cpm; dies entsprach 14% der eingesetzten Radioaktivität.

Dieses Rohprodukt wurde mittels Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 (0.2 mm, auf Kunststoffolie, Laufmittel n-Propanol:-NH_3:H_2O 6:3:1) auf Radioaktivität und Phosphat analysiert. Es zeigte sich, daß außer FPP eine weitere nicht phosphorylierte Substanz radioaktiv markiert vorlag. Hierbei konnte es sich entweder um Farnesol oder um Squalen handeln, letzteres wird schnell durch mikrosomale Verunreinigungen der Proteinfraktion gebildet (23). Aus diesem Grund wurde eine weitere Reinigung des Rohprodukts über eine DEAE-Cellulose-Säule durchgeführt (2 x 12 cm, äquilibriert und eluiert mit Methanol (0.08 M Ammoniumformiat). Farnesylpyrophosphat wurde bei einem Elutionsvolumen von 180 -

420 ml eluiert, die unbekannte Substanz zwischen 30 - 120 ml. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, das Methanol wurde durch mehrmaliges Abziehen von 0.01 M NH_4OH am Rotationsverdampfer entfernt, ^{14}C-FPP wurde ein weiteres Mal an XAD-2 gebunden und zuletzt mit Methanol (0.01 M NH_3) eluiert. Das Präparat wurde nach Entfernung des Methanols in 1 M Tris/HCl pH 8.0 aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.
Das Präparat enthielt 1 x 10^6 cpm = 1.8 µMol tt-FPP und damit 6% der theoretisch möglichen Ausbeute.

Die R_f-Werte sämtlicher synthetisierter Pyrophosphatverbindungen im angegebenen DC-System gehen aus Tab. 1 hervor.

Tabelle 1: R_f-Werte der verschiedenen synthetisierten Mono- und Diphosphate
DC auf Kieselgel 60 (0.2 mm, Alufolie), entwickelt in n-Propanol:NH_3:H_2O 6:3:1

	Dimethylallyl-	Isopentenyl-	Geranyl-	Farnesyl-
Monophosphat	0.44-0.54 (0.43)	0.35-0.45 (0.38)	0.44-0.53	0.59-0.69 (0.64)
Diphosphat	0.29-0.39 (0.18)	0.12-0.25 (0.15-0.20)	0.34-0.44	0.40-0.54 (0.54)

Anfärbung mit dem Reagenz nach Hanes und Isherwood (100). In Klammern sind die Literaturwerte angegeben.

2.4.6.6 Enzymatische Synthese von ^{14}C-Ketoisocapronsäure aus ^{14}C-Leucin

Um die Bedeutung von 2-Ketoisocapronsäure (KIC) als Vorstufe der Sesquiterpene in S.arenae TÜ 469 abzuschätzen, wurde ^{14}C-KIC in Verfütterungsexperimenten eingesetzt. ^{14}C-Ketoisocapronsäure wurde aus ^{14}C-Leucin enzymatisch mit L-Aminosäureoxidase gewonnen.

100 µl ^{14}C-Leucin (5 µCi = 15 nMol) wurden in 200 µl 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 gelöst und mit 5 mg Katalase und 5 µl L-Aminosäureoxidase (1 mg/ml, 7 U/mg) versetzt und 15 min bei 30°C inkubiert. Die Analyse der Umsetzung erfolgte über Dünnschichtchromatographie an Kieselgel 60 (0.2 mm, Kunststoffolie, entwickelt in Butanol:H_2O:Essigsäure 8:2:2) nach Zusatz von Trägersubstanzen. Die Anfärbung erfolgte mit Dichlorphenolindophenol in Äthanol, die Radioaktivität wurde in 1 cm Abschnitten ausgezählt. Die Umsetzung erwies sich als quantitativ. Das Produkt ^{14}C-KIC wurde ohne weitere Reinigung nach Sterilfitration Kulturen zugesetzt, die auf Resting cell Bedingungen umgesetzt worden waren.

2.4.6.7 Synthese von (±) Pentalenen aus Humulen

Als kalter Träger wurde für die Bestimmung der FPP-Zyklase Pentalenen benötigt. Außerdem sollte die Möglichkeit, Pentalenen als Vorstufe zu verfüttern, sowie die Hemmaktivtät der Substanz im enzymatischen Test festgestellt werden. Da Pentalenen aus den Zellen von S.arenae TÜ 469 nicht in genügender Menge zu isolieren war, wurde die Substanz aus dem Sesquiterpen Humulen durch Umsetzung mit Quecksilbernitrat synthetisiert. Die Synthese erfolgte nach Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe von Prof. Shirahama (65,67) in einem modifizierten Verfahren, das auf einer persönlichen Mitteilung von Prof. Shirahama beruht. Das Prinzip der Synthese geht aus Abb. 8 hervor, zum Vergleich sind in Abb. 9 die hypothetischen Schritte der Enzymkatalyse nach Cane (17) dargestellt.

Oxymercurierung von Humulen

Zu einer heftig gerührten Lösung von 1.0 g Humulen in 20 ml THF:H_2O 1:1 wurden bei 0°C 5 g $Hg(NO_3)_2$ x 2 H_2O zugegeben. Die schwachgelbe Lösung wurde bei 0°C 30 min und anschließend bei 60 °C 3 h unter Rückfluß gerührt. Hierbei erfolgte ein Farbumschlag über orange nach grau. Nach Abkühlen der Lösung auf 0°C wurden 1.8 g KBr in 5 ml H_2O gelöst zugegeben und weitere 15 min gerührt. Der pH der Lösung wurde mit 5 N NaOH auf 11 eingestellt, 800 mg KBH_4 zugegeben und 30 min bei 0°C gerührt. Nach weiteren 3 - 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch durch Cellite filtriert und hierbei das metallische Quecksilber abgetrennt. Das Filter wurde mit THF:H_2O 1:1 nachgespült und das Filtrat mit Diäthyläther extrahiert. Die Ätherphase wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Nacht über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Äthers in vakuo wurde das erhaltene Öl in Hexan : Äthylacetat 9:1 aufgenommen und über eine Kieselgelsäule (Kieselgel 60, 1 x 30 cm) mit Hexan:Äthylacetat 9:1 und Hexan: Äthylacetat 7:3 chromatographiert. Die Analyse der Chromatographien erfolgte mit HPTLC, entwickelt in Hexan: Äthylacetat 9:1, bzw. 7:3 und durch Anfärbung mit Anisaldehyd.
Ausbeuten: I: 100 mg; II: 300 mg

Umsetzung von II über III zu I:

300 mg II wurden in 10 ml Äther aufgenommen und bei 0°C unter Rühren mit 1.5 ml PBr_3 versetzt und 1 h bei 0°C und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin wurde die Lösung in 50 ml Eis-Wasser-Gemisch getropft und mit Äther extrahiert. Die mit Natriumchloridlösung gewaschene Ätherphase wurde über Natriumsulfat getrocknet, der Äther abgezogen und der ölige Rückstand in 5 ml DMSO aufgenommen. Bei Raumtemperatur wurde unter Stickstoff 250 mg tert.-Amylalkoholat zugegeben und die Lösung 3 h unter Rückfluß bei 80°C gerührt. Die auf 0°C abgekühlte Lösung wurde in ca. 50 ml Eiswasser getropft und mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wurde gewaschen und getrocknet. Nach Abzie-

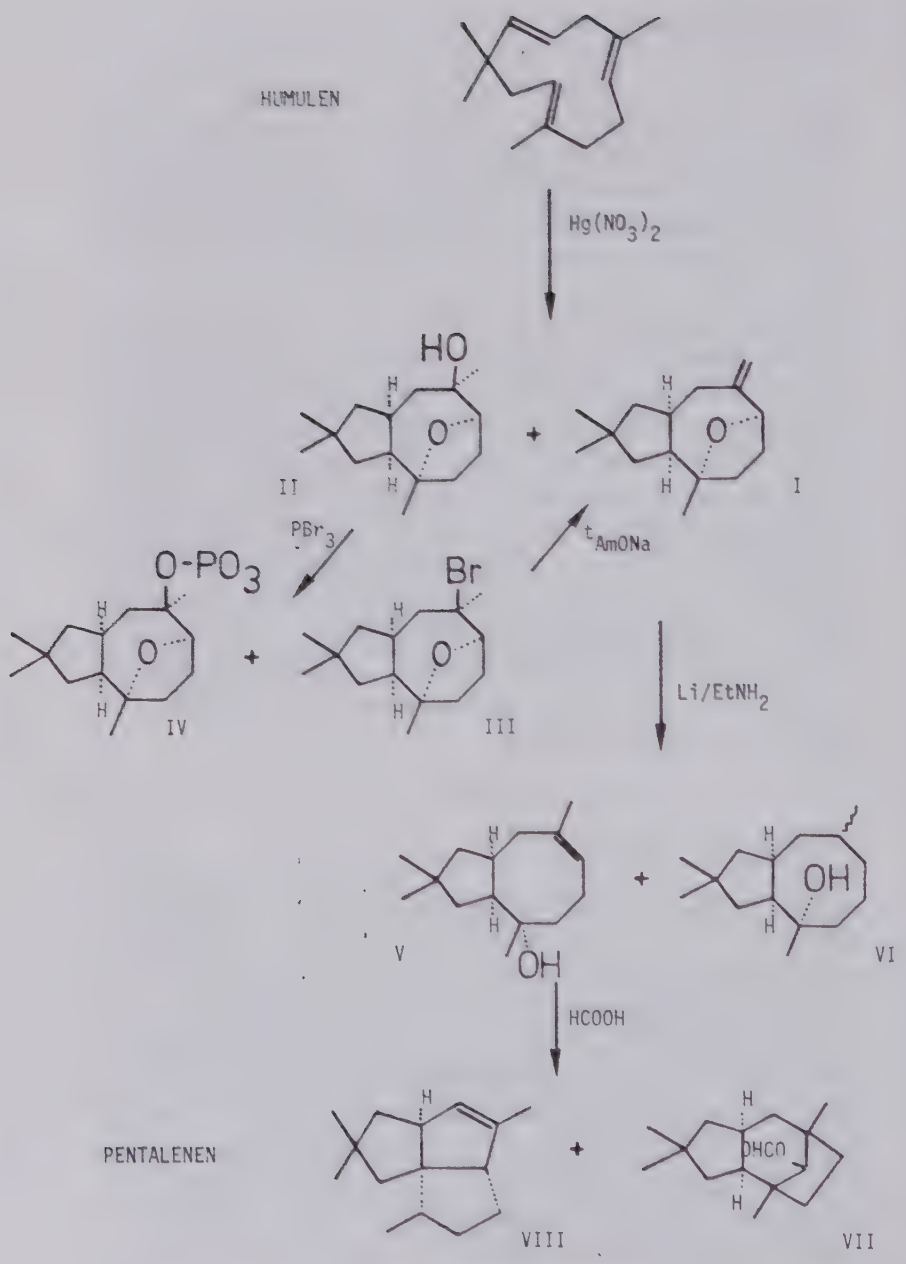


Abb. 8

Synthese von (±) Pentalenen aus Humulen nach Shirahama (pers. Mitteilung)

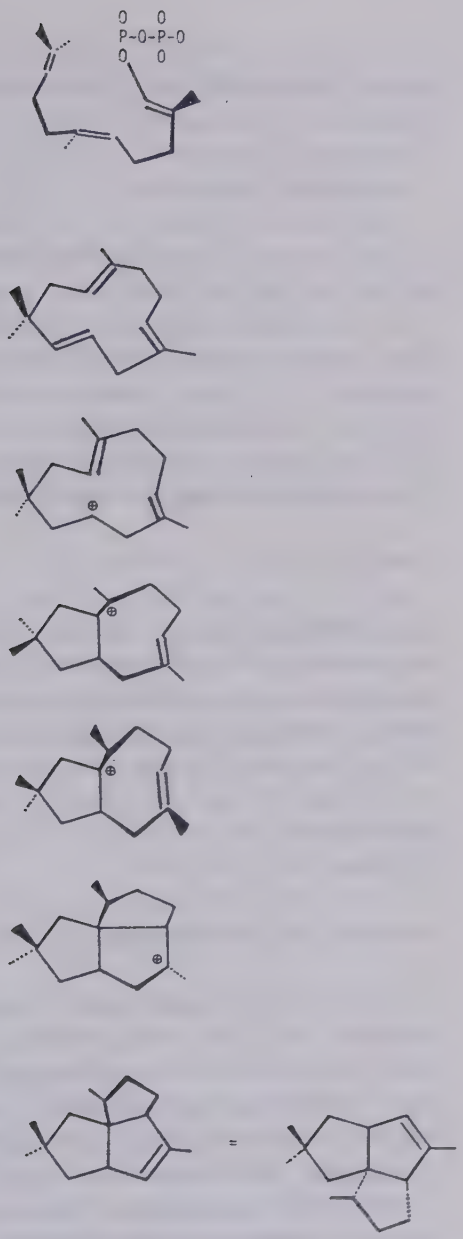


Abb. 9:
Hypothetischer Ablauf der enzymatischen Synthese von Pentalenen aus tt-FPP durch die Farnesylpyrophosphat Zyklase nach Cane (17).

hen des Äthers wurde das Öl über Kieselgel (s.o.) aufgetrennt.
Ausbeuten: I: 200 mg; II: 100 mg

Umsetzung von I nach V:

300 mg I wurden in 10 ml Äthylamin:THF 9:1 (wasserfrei) aufgenommen und bei -78°C mit 15 mg metallischem Lithium versetzt. Nach 1 - 3 h löste sich das Lithium mit blauer Farbe. Danach wurde noch 30 min gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 1 g NH_4Cl gestoppt. Evtl. noch vorhandenes Lithium wurde entfernt, das Äthylamin am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand mit 20 ml H_2O versetzt und mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wurde nach Trocknung über Na_2SO_4 ohne Reinigung weiter-verarbeitet.

Formolyse von V:

Die Ätherphase wurde einrotiert, das Öl in 2 ml Acetanhydrid aufgenommen, mit 6 ml Ameisensäure (98%) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde in gesättigte $NaHCO_3$-Lösung getropft, mit Hexan extrahiert, die Hexanphase über Na_2SO_4 getrocknet und das Hexan am Rotationsverdampfer entfernt. Das Öl wurde in Hexan:Äthylacetat 9:1 aufgenommen und auf einer Kieselgelsäule (10 x 280 mm) mit Hexan aufgetrennt.
Ausbeute: 30 mg Rohprodukt

Reinigung des Pentalenen-Rohprodukts:

Eine DC-Platte (0.5 mm Kieselgel 60) wurde mit 15% $AgNO_3$-Lösung besprüht und 1 h bei 100°C getrocknet. Auf einer 5 cm breiten Bahn wurde das Rohprodukt aufgetragen und in n-Hexan entwickelt. Eine Kontrollbahn wurde abgetrennt, mit Antimon(III)chlorid in Chloroform besprüht und 10 min bei 100°C erhitzt. 3 Substanzflecken mit den R_f-Werten 0.0 - 0.1; 0.1 -0.15 und 0.2 - 0.3 konnten nachgewiesen werden. Das Kieselgel im Bereich von R_f 0.2 bis 0.4 wurden in einZentrifugenglas transferriert, das Pentalenen mit 15 ml Äthylacetat vom Kieselgel eluiert und die Kieselgelschicht durch Zentrifugation abgetrennt. Die Äthylace-

tatphase wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und in 1 ml Äthylacetat wiederaufgenommen. Die Lösung wurde auf DC-Platten aufgetragen (0.5 mm , Kieselgel 60 auf Glas, 5 cm breite Bahnen) und in Hexan:Äthylacetat 9:1 entwickelt. Das Kieselgel im Bereich von R_f 0.5 - 0.7 wurde mit Äthylacetat eluiert, das Äthylacetat am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Hexan aufgenommen und das Hexan im Vakuum abdestilliert.
Ausbeute: 3 mg

Die Identifizierung des Pentalenens erfolgte durch ^{1}H-NMR, IR-Spektrum und Gaschromatographie.

2.4.6.9 Hydrolyse von Glycerinaldehyd-3-phosphat diäthylacetal

200 mg D,L-GAP diäthylacetal (Cyclohexylammoniumsalz) wurden in 36 ml dest. Wasser gelöst und nach Zusatz von 2 ml 2 M H_2SO_4 7.5 min bei 80°C hydrolisiert. Der Ansatz wurde im Eisbad abgekühlt, mit ca. 2 ml 2 M Na_2CO_3 auf pH 4.5 - 5.0 eingestellt und in 4 ml Portionen bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration wurde mit dem GAPDH-Test mit Enzym aus Kaninchenmuskel (40 µl 1:100 verd.) als Endpunktsbestimmung ermittelt.

2.4.7 Vorbereitung und Einbettung von Proben für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen

2.4.7.1 Einbettung von Proben für die Lichtmikroskopie

Um Aufschluß über die Struktur der Pellets zu gewinnen, wurde Mycel aus Minimalmediumkulturen in Paraffin eingebettet, geschnitten und anschließend mit Hämatoxylin angefärbt. Die Arbeitsschritte erfolgten in der von Wittler (113) angegebenen Folge. Mycelpellets einer Kultur in Minimalmedium wurden 48 h nach Animpfen entnommen und in Äthanol-Wasser-Gemischen entwässert. Die Pellets wurden nach je 15 min in 70%(2x), 80%(2x), 90%,

95%, 100% Äthanol in Benzoesäuremethylester überführt und 2 x je 24 h darin inkubiert. Anschließend wurden die Proben je 30 min in Toluol, bzw. in Toluol:Paraffn (1:1) gehärtet, sodann in Paraffin 1 (Schmp. 42-48°C) 3 h und ebensolange in Paraffingemisch 2:3 (Paraffin 1/2) inkubiert und in Paraffin 2 (Schmp. 51-53°C) in Formen gegossen und nach dem Erstarren geschnitten. Die Schnitte wurden mit 0.2% Gelatinelösung auf Objektträgern festgeklebt und 4 Tage bei RT getrocknet. Die Färbung erfogte mit Hämatoxylinlösung in einer Verdünnung 1:100. Die Schnitte wurden hierzu durch je 5 min Aufenthalt in Xylol (2x), Äthanol 100%, 95%, 80%, 70% entparaffiniert, 20 min gewässert und 30 min mit Delafields Hämatoxylinlsg. (1:100) angefärbt. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch 20 min Wässern entfernt, die Schnitte mit Äthanol erneut entwässert und in Xylol und Balsam konserviert.

2.4.7.2 Vorbereitung und Einbettung der Mycelproben für die Elektronenmikroskopie

Die Zellen wurden gewaschen und über Nacht bei RT in 25% Glutardialdehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer fixiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C in Eppendorf-cups. Die Proben wurden mit der Waschlösung sechsmal gewaschen (10 min), 120 min in Osmiumtetroxidlösung nachfixiert und mit H_2O bidest sechsmal je 10 min ausgewaschen. Die Kontrastierung erfolgte mit 1% wässrigem Uranylacetat während 60 min im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben dreimal mit H_2O bidest. gewaschen und durch je 15 min Aufenthalt in 50%, 70%, 85%, 95%, 100%, 100% Äthanol dehydratisiert. Nach dem Entwässern wurden die Proben zweimal 10 min mit Propylenoxid infiltriert, anschließend 30 und 90 min mit Propylenoxid/Eponmischung B (1:1) und zuletzt über Nacht in Eponmischung B. Die Polymerisierung erfolgte nach Überführen der Proben mit frischer Eponmischung in Gelatinekapseln bei 60°C während 48 h. Nach erfolgter Polymerisierung wurden die Gelatinekapseln mit kochendem Wasser abgelöst, die Blöckchen mit Glasmessern getrimmt und am Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden mit Bleicitratlösung nachkontrastiert und im EM-109 untersucht.

2.4.8 Enzymisolierungen und Proteolyseansätze

2.4.8.1 Isolierung von PL-sensitiver und PL-insensitiver GAPDH aus S.arenae TÜ 469

Mit der nachfolgend beschriebenen Methode konnten beide Isoenzyme aus S.arenae bis zur Homogenität gereinigt werden, wobei das Ausgangsmaterial aus 24 h Fermenterkulturen in Wickerham Medium, bzw. aus 48 h Fermenterkulturen in Minimalmedium bestand, je nachdem, welches Isoenzym gereinigt werden sollte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einer Durchlaufzentrifuge geerntet und mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8.0, 5 mM Mercaptoäthanol, 5 mM EDTA, 1 µM NAD) gewaschen. Anschließend wurde das Mycel im gleichen Puffer suspendiert und mit dem gleichen Volumen an Glasperlen (0.5 mm) versetzt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 5 min Behandlung des Gemischs in einer Küchenmaschine. Hierbei wie bei allen weiteren Reinigungsschritten wurde bei +4°C gearbeitet. Das Homogenat wurde von den Glasperlen dekantiert, die Glasperlen mit wenig Trispuffer nachgespült und die vereinigten Überstände 20 min bei 6000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Dem Überstand dieser Zentrifugation wurde 1 g Cellite pro 100 mg Protein unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde die Suspension während 30 min durch Zugabe von gepulvertem Ammoniumsulfat auf 85% Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht und nach 1 h weiteren Rührens 30 min bei 15 000 x g zentrifugiert.
Der Niederschlag der Zentrifugation wurde in Trispuffer (s.o.), der 85% gesättigt an Ammoniumsulfat war, suspendiert. Die Suspension wurde in eine Säule gegossen (6 cm) und diese nach Absetzen des Gelbetts mit einem linearen Gradienten (600 ml) von 85% auf 40% Ammonsulfat-gesättigtem Trispuffer eluiert. Enzymatisch aktive Fraktionen wurden vereinigt und 24 h gegen 5 l Tris-Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde auf eine DEAE-Sephacel-Säule (1 x 12 cm) aufgetragen, die in Trispuffer äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten (300 ml) von Trispuffer, der 0 - 0.5 M NaCl enthielt. Anschließend wurde das Enzym auf einer Biogel A 0.5m Säule (2 x 150 cm) chromatographiert, die ebenfalls in Trispuffer äquilibriert worden war.

Aktive Fraktionen wurden durch Dialyse auf 10 mM Kaliumphosphatpuffer umgepuffert (pH 6.9, 5 mM Mercaptoäthanol) und auf eine Biogel HTP-Säule aufgetragen, die im gleichen Puffer äquilibriert war. Die Elution erfolgte hier mit einem linearen Gradienten von 10 auf 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9). Aktive Fraktionen wurden vereinigt und auf einer Biogel P 6 Säule (2 x 50 cm), die in Trispuffer äquilibriert war, umgepuffert. Die Aufbewahrung erfolgte bei +4°C.

2.4.8.2 Proteolyseansätze von gereinigter GAPDH aus Streptomyceten mit Papain und Clostripain

Proteolyseansatz mit Papain

Je 3 ml (ca. 200 µg) Enzymlösung mit gereinigter GAPDH aus Streptomyces arenae TÜ 469 wurde mit einem gleichen Volumen 25% Trichloressigsäure gefällt, entsprechend wurden 200 µg GAPDH aus Kaninchenmuskel und Hefe behandelt. Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert und in 250 µl Tris/HCl, pH 7.5 (0.5% SDS, 10% Glycerin, 0.001% Bromphenolblau) aufgenommen und 5 min im Wasserbad gekocht. 50 µl wurden als unbehandelte Kontrolle entnommen, 200 µl wurden nach Abkühlen auf Raumtemperatur mit 5 µl Papainlösung (3.3 mg/ml) versetzt und 7.5 min bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl 2-Mercaptoäthanol und 10 µl 10% SDS zugegeben, 10 min bei 90°C erhitzt und der Ansatz auf 15% Acrylamidgelen aufgetrennt.

Proteolyseansatz mit Clostripain

Je 3 ml Lösung mit gereinigten GAPDH-Isoenzymen aus S.arenae, bzw. 200 µg GAPDH aus Kaninchenmuskel und Hefe in 3 ml 0.125 M Tris/HCl pH 7.5 (0.5% SDS, 10% Glycerin, 0.001% Bromphenolblau) wurden mit 1.44 g Harnstoff (8M) und 35 µl 2-Mercaptoäthanol (150 mM) versetzt und 1 h inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Jodacetatlösung (0.546 g/ 600µl) zugegeben. Dieser Ansatz wurde zwei Tage bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3 Tage gegen 5%

Essigsäure (5 mM Mercaptoäthanol) dialysiert. Diese Vorbehandlung war notwendig geworden, nachdem sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß Clostripain GAPDH erst nach Denaturierung mit Jodacetat oder PL angreifen kann. Das Dialysat wurde lyophilisiert und in 400 µl Tris/HCl (s.o.) aufgenommen und erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden 5 µl einer 1 mg/ml Clostripainlösung zugegeben und 1.5 h bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden 35 µl 10% SDS und 35 µl Mercaptoäthanol zugegeben, die Ansätze 5 min aufgekocht und auf 15% Acrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.8.3 Anreicherung von Mannit Dehydrogenase aus S. arenae

Zur Bestimmung der Konzentration von Mannit in Fermenterkulturen wurde Mannit Dehydrogenase aus Streptomyces arenae verwendet, wozu die Aktivität aus dem Rohextrakt angereichert und von zelleigenem Mannit getrennt wurde.
Die Gewinnung und der Aufschluß der Zellen erfolgte wie unter 2.4.8.1 beschrieben. Auch ein Aufschluß mit Ultraschall erwies sich als möglich. Zelltrümmer wurden durch 15 min Zentrifugation bei 6000 x g entfernt und der Überstand mit gepulvertem Ammoniumsulfat auf 20% Sättigung gebracht und abzentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde mit weiterem Ammoniumsulfat auf 50% Sättigung gebracht und nach 30 min Rühren bei 4°C 20 min mit 7000 x g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 50 mM Trispuffer pH 8.0 aufgenommen und nach Dialyse gegen denselben Puffer in den Test zur Mannit-Bestimmung eingesetzt.

2.4.8.4 Präparation einer Enzymfraktion aus Rattenleber zur enzymatischen Synthese von ^{14}C-tt-FPP

Zur Synthese von ^{14}C-tt-Farnesylpyrophosphat aus ^{14}C-IPP oder ^{14}C-Mevalonsäure wurde nach Popjak (78) eine Enzymfraktion aus Rattenleber isoliert. Eine Ratte wurde dekapitiert, die Leber entnommen und auf Eis gekühlt. Bindegewebe und Blutgefäße wurden

entfernt und die Leber in sehr kleine Stücke geschnitten. Diese wurden mit dem 2.5 fachen Volumen an 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 (5 mM $MgCl_2$, 2 mM $MnCl_2$, 30 mM NAD) versetzt und im Glas-Teflon-Homogenisator während 10 min in schmelzendem Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 20 min bei 15 000 x g zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde vorsichtig dekantiert und durch Gaze filtriert, die mit etwas Puffer angefeuchtet worden war. Das Filtrat wurde 3 h bei 100 000 x g zentrifugiert. Das Sediment bestand aus einer opaken Glykogenschicht und einer braunen Mikrosomenschicht. Der Überstand wurde äußerst vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen, ohne das Mikrosomensediment aufzuwirbeln. Alle Enzyme zur Synthese von Farnesylpyrophosphat aus Mevalonsäure befinden sich in der Fraktion aus dem 100 000 x g Überstand, die zwischen 30% und 60% Sättigung an Ammoniumsulfat gefällt wird. Aus diesem Grund wurde der Überstand während 30 min mit gepulvertem Ammoniumsulfat auf 30% Sättigung gebracht und anschließend 30 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bis zu 60% Sättigung versetzt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde auf Filterpapier leicht getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

Zur Rekonstitution wurde das Pellet in 0.02 M $KHCO_3$ pH 8.3 gelöst, 3 h gegen 5 l 0.02 M $KHCO_3$ dialysiert und 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Die Präparation konnte in dieser Form bis zu 2 Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.
Ausbeute: 13 ml einer Proteinlösung mit 24 mg/ml.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstum und Pentalenolactonproduktion von Streptomyces arenae TÜ 469 in komplexem und definiertem Medium

Auf der Suche nach Faktoren, die die Produktion von Pentalenolacton in Submerskulturen beeinflussen, wurden Morphologie, Wachstum und PL-Bildung von S.arenae TÜ 469 in verschiedenen Medien untersucht. Als Beispiele von komplexen Medien wurden Hefe-Malz-Extrakt- und Wickerham Medium gewählt, als definierte Medien das Minimalmedium nach Zdunek (116) und das nach Optimierung der Salzkonzentrationen resultierende Minimalmedium, das unter 3.3.1 beschrieben ist.

Der Stamm S.arenae TÜ 469 wuchs nach Beimpfen von komplexem Medium mit Sporen oder Mycel in Form eines feinen, filamentösen Mycels mit nur schwach ausgeprägter Neigung zur Pelletbildung (siehe Abb. 10). Aus diesem Grund zeichneten sich die Kulturen in komplexem Medium durch ausgeprägt hohe Viskosität aus. Das Mycel wuchs in Submerskultur während 36 h annähernd logarithmisch und begann nach 96 h zu lysieren. Zu dieser Zeit wurde eine PL-Konzentration zwischen 0 und 50 µg/100 ml gemessen. In den Fällen, in denen eine PL-Bildung nachgewiesen werden konnte, trat diese unmittelbar vor Beginn der Autolyse auf.

Mit Mycel, das 24 h in Wickerham Medium gewachsen war, wurden alle im folgenden untersuchten Medien beimpft, da sich gezeigt hatte, daß nach Inokulation mit Sporen oder PL-produzierenden Zellen nicht immer reproduzierbare Verläufe von Wachstum und Produktion gemessen wurden.

In definiertem Minimalmedium wuchs der Stamm in Form von festen, gelbgefärbten Mycelkugeln (Pellets), die einen Durchesser von bis zu 5 mm erreichen konnten. Diese Morphologie wird aus den lichtmikroskopischen Abbildungen 11 ersichtlich. Pellets, die nach 48 h in Minimalmedium entnommen wurden, wurden anschließend fixiert, zentral geschnitten und mit Hämatoxylinlösung angefärbt. Hierbei wurde deutlich, daß bereits zu diesem Zeitpunkt die Pellets aus Schichten unterschiedlich vitaler Zellen bestanden.

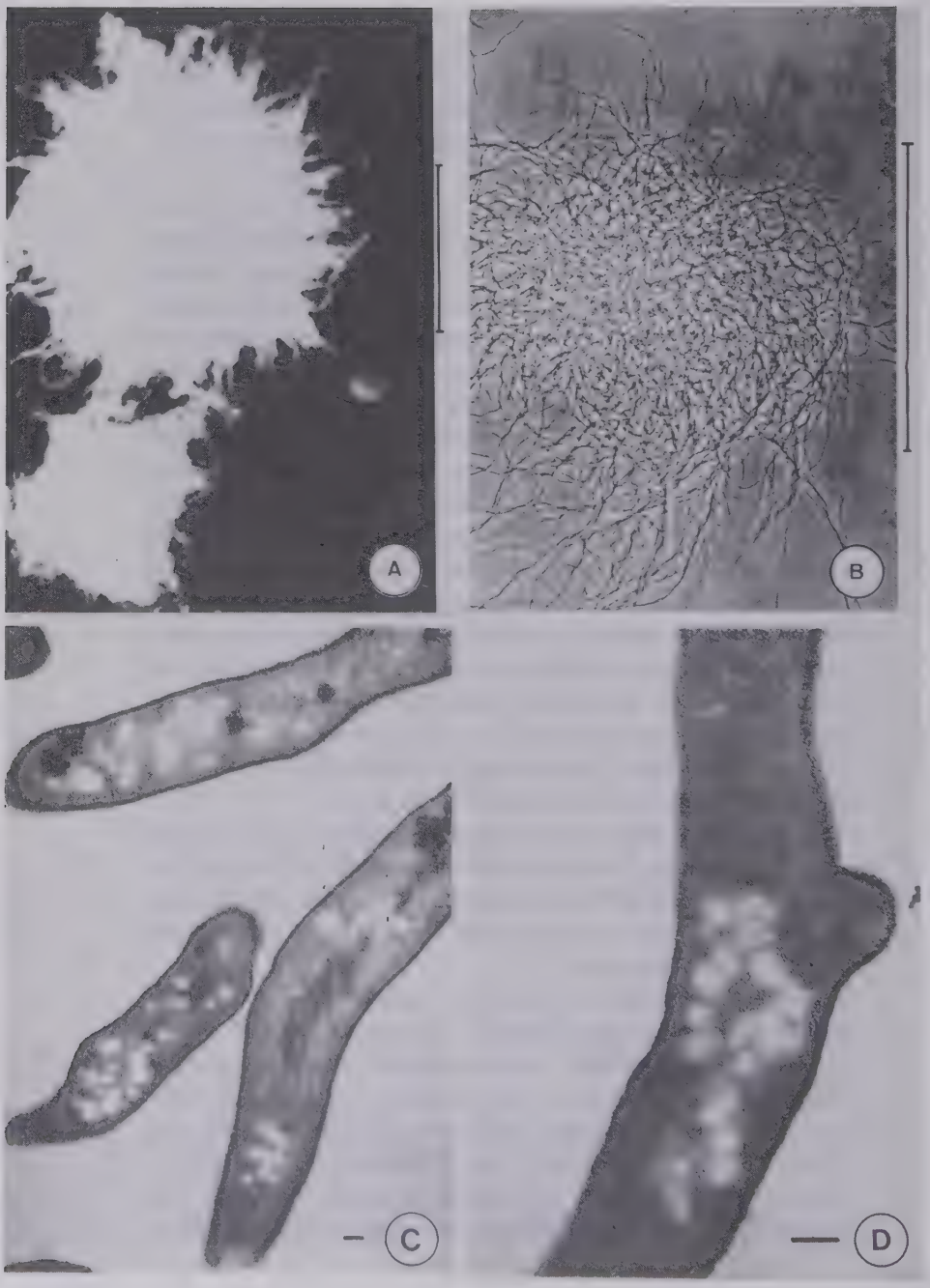

A
B
C
D

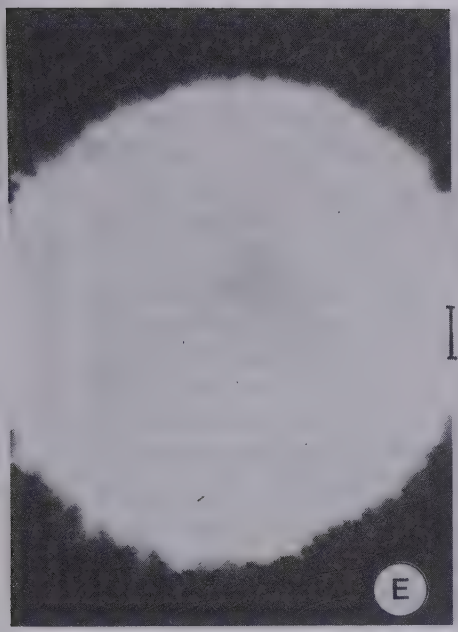
Abb. 10:
Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Darstellung der Struktur von Zellen bzw. Mycel von S.arenae TÜ 469 24h nach Anzucht in komplexem Medium

Abb. 10 A und 10 B zeigen das lichtmikroskopische Bild im Dunkelfeld und Phasenkontrast. Die Markierungen entsprechen einer Länge von 0.1 mm.

Abb. 10 C und 10 D zeigen die Struktur der Zellen im transmissionselektronenmikroskopischen Bild. Die Balken entsprechen einer Länge von 0.2 µm. Aus beiden Abbildungen wird die relative Homogenität der Zellen und der hohe Gehalt an Membranen ersichtlich.

Abb. 11:
Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Darstellung der Struktur der Zellen bzw. Pellets einer Kultur von S.arenae TO 469 in Minimalmedium nach 48 h (Minimalmedium nach Zdunek (116)).

In Abb. 11 A-D sind Zellen aus den verschiedenen Zonen eines Pellets im elektronenmikroskopischen Bild dargestellt. Die Balken entsprechen einer Länge von 0.2 µm.
Abb. 11A zeigt vitale Zellen, die sich nur durch stärkere Vakuolisierung von Zellen unterscheiden, die in komplexem Medium angezogen wurden.



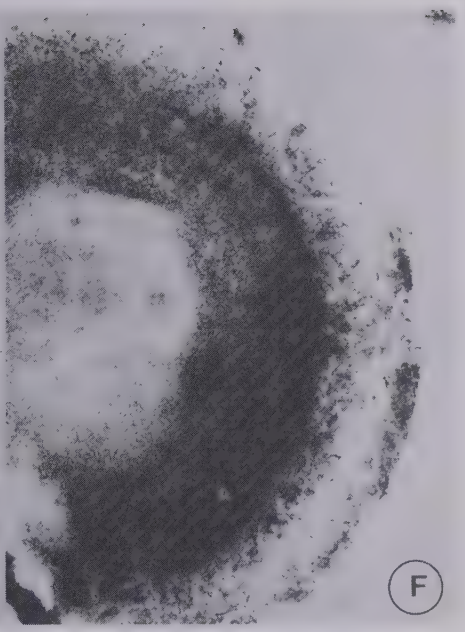


Abb. 11B zeigt Membransysteme innerhalb einer vitalen Zelle
Abb. 11C stellt ein Beispiel für Zellwachstum innerhalb einer Hyphe dar. Auf diese Weise kann das Zustandekommen von sekundären Zellwandstrukturen erklärt werden.
Abb. 11D zeigt Zellen aus einer Zone des Pellets, in der bereits teilweise Autolyse der Zellen erfolgt ist.

Abb. 11E und 11F zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen der Pellets nach 48 h
In Abb. 11E ist ein Pellet im Dunkelfeld und in Abb. 11E als zentraler Dünnschnitt nach Anfärbung mit Delafields Reagenz dargestellt. Die Markierung stellt eine Länge von 0.1 mm dar.
Aus dem Vergleich von Abb. 10A mit Abb. 11E wird der Grössenunterschied zu Mycel aus komplexem Medium deutlich.
Bei Abb. 11F wird die zentrale Schicht lysierender oder bereits lysierter Zellen deutlich, an die sich eine offensichtlich vitale Schicht anschließt.

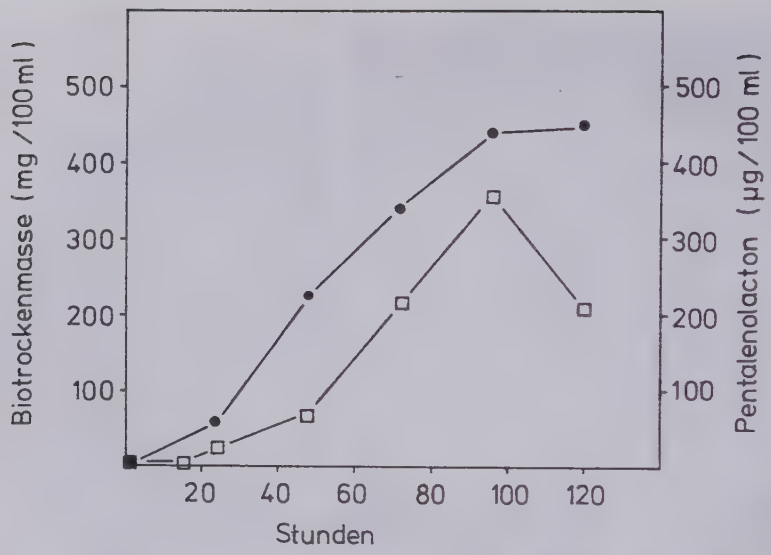


Abb. 12 : Verlauf von PL-Produktion und Zellwachstum in einer 100ml Minimalmediumkultur vor der Optimierung der Mineralsalzkonzentration.

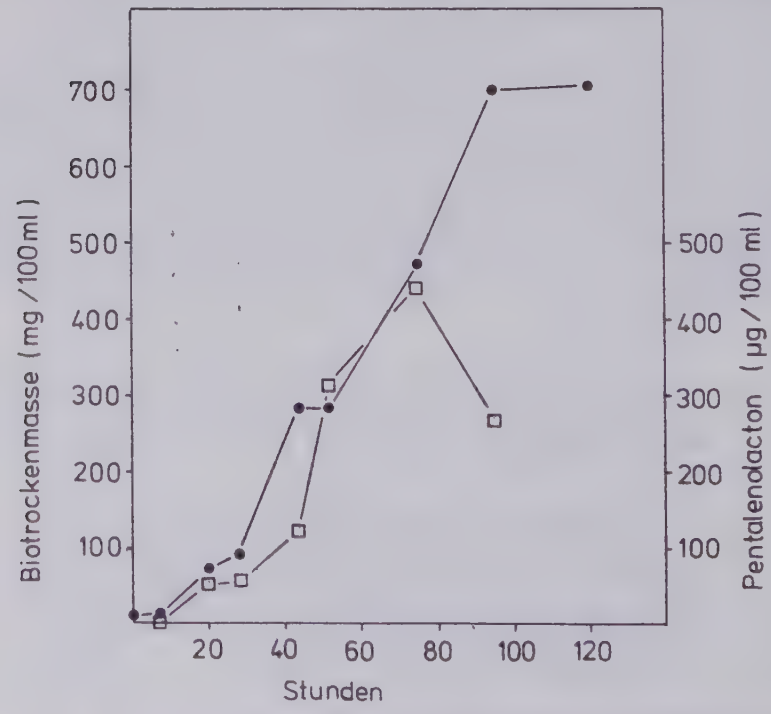


Abb. 13 : Verlauf von PL-Produktion und Zellwachstum nach Optimierung der Mineralsalzkonzentration (□)PL, (●) Trockengewicht d. Mycels

auf dese Weise einheitlichere Kulturen resultierten.
Vor dem Hintergrund dieser morphologischen Aspekte sollte das Wachstum und die PL-Produktion der Zellen in definiertem Medium untersucht werden. Als Parameter für das Zellwachstum wurde zunächst das Trockengewicht des Mycels bestimmt. In Abb. 12 und 13 ist die zeitliche Entwicklung von Trockengewicht und Pentalenolactonproduktion vor und nach Optimierung der Salzkonzentration in Minimalmedium dargestellt. In beiden Medien verläuft die PL-Bildung anscheinend fast kongruent zum Wachstum.
In ausgeprägtem Maß gilt dies für Fermentationen von S.arenae TÜ 469 in Minimalmedium, wie aus dem abgebildeten Beispiel einer Normfermentation hervorgeht (Abb. 14 zitiert nach (54)).
Der Zusammenhang zwischen Wachstum und Produktion wurde in Form der mycelspezifischen Produktionsrate q abgeschätzt. Dieser metabolische Quotient wurde aus Abb. 13 mit Hilfe des Verlaufs der beiden Kurven ermittelt. Sein Verlauf während einer Kultur geht aus Abb. 15 hervor. Die spezifische Produktionsrate besaß ein Maximum zu Beginn der Produktion nach 30 -50 h Kulturzeit. Auch hier muß die Frage diskutiert werden, inwiefern dieser Verlauf von q nur auf die Eigenart pelletartigen Wachstums zurückzuführen ist oder weiterreichende Bedeutung für den Verlauf und die Regulation von Sekundärmetabolismus und Differenzierung einer Kultur besitzt.
Eine weitere Problematik bei pelletförmigem Wachstum liegt in der Bestimmung der Zelltrockenmasse als Maß für das Wachstum. Es wurde deshalb der Verlauf von DNA und Proteingehalt einer Kultur in modifiziertem Minimalmedium untersucht. Unter der Voraussetzung quantitativer Extraktion liegt damit ein besseres Maß für das Zellwachstum vor. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 16 dargestellt. Da DNA und Protein anscheinend einen vergleichbaren Verlauf wie die Zelltrockenmasse zeigten, wurde der prozentuale Anteil von DNA und Protein am Trockengewicht während Ablauf einer Kultur bestimmt. Mit geringen Abweichungen ergaben sich konstante Werte von 0.30% DNA und 7.7% Protein. Damit war sichergestellt, daß DNA- und Proteingehalt den gleichen Verlauf besitzen wie das Trockengewicht einer Kultur. Das Trockengewicht kann folglich als Maß für das Zellwachstum verwendet werden. Ver-

Unter einer obersten Schicht offensichtlich vitaler Zellen fanden sich zum Zentrum hin Mycelschichten, die sich in der Absterbe- oder Autolysephase befanden. Dieses Bild entspricht der Beschreibung von pelletartigem Wachstum (81,113). Pelletbildung beruht auf der relativ zum Längenwachstum in kurzen Abständen erfolgenden Querverzweigung von Bakterienzellen und Pilzhyphen. Als Faktoren, die zur Pelletbildung führen, sind pH, Metallionen und, wie im vorliegenden Fall, der Wechsel zwischen komplexem und definiertem Medium beschrieben (81).

Wurde Mycel aus komplexem und definiertem Medium elektronenmikroskopisch untersucht, so waren die beobachtbaren Unterschiede nicht sehr auffallend, solange vitale Zellen miteinander verglichen wurden. In der Literatur wird häufig eine Veränderung von Membran- und Zellwandstrukturen bei Veränderung der Kulturbedingungen beschrieben (57,64). Dies konnte bei Zellen von S.arenae TÜ 469 nach Wechsel von komplexem auf Minimalmedium nicht festgestellt werden. Bei derartigen Vergleichen (siehe Abb. 10 und 11) fiel lediglich auf, daß auf komplexem Medium angezogene Zellen stärker mit Membranen strukturiert schienen als Zellen aus Minimalmedium. Diese schienen sehr viel differenzierter zu sein, enthielten mehr und verschiedenartigere cytoplasmatische Einschlüsse von Lipidglobuli, Polyhydroxybuttersäuregranula und Cytoplasmavakuolen. In Zellen, die aus dem Bereich der Sauerstoff- und Substratverarmung des Pellets stammten, konnten typische Phänomene limitierten Wachstums wie Wachstum innerhalb der Hyphen, sekundäre Zellwandsynthese und Autolyse festgestellt werden (57).

Aus den beschriebenen Beobachtungen ging hervor, daß in Minimalmedium zumindest zeitweise physiologisch heterogene Kulturen vorlagen. Um ein Maß für die Heterogenität zu haben, wird bei Pelletwachstum oft eine Relation zwischen vitaler Zone und Pelletradius abgeschätzt. Im abgebildeten Beispiel beträgt das Verhältnis ungefähr 0.5. Dies unterstreicht die offenbare Heterogenität der Kultur. Es erwies sich deshalb als glücklicher Umstand, daß im Verlauf der Medienoptimierung (siehe 3.3) der durchschnittliche Pelletdurchmesser auf Werte unter 0.5 mm absank und

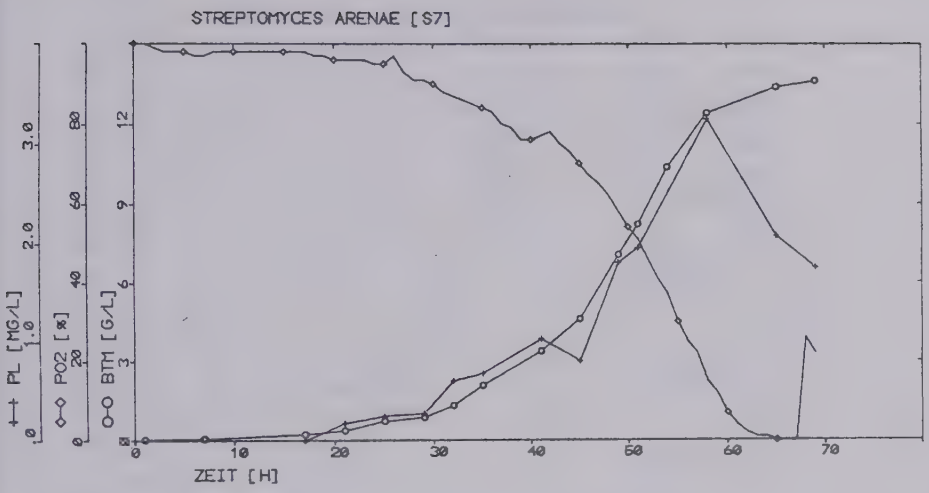


Abb. 14 :
Myceltrockengewicht, Sauerstoffgehalt und PL-Konzentration im Kulturfiltrat einer Normfermentation von S.arenae TO 469 in Minimalmedium (54).

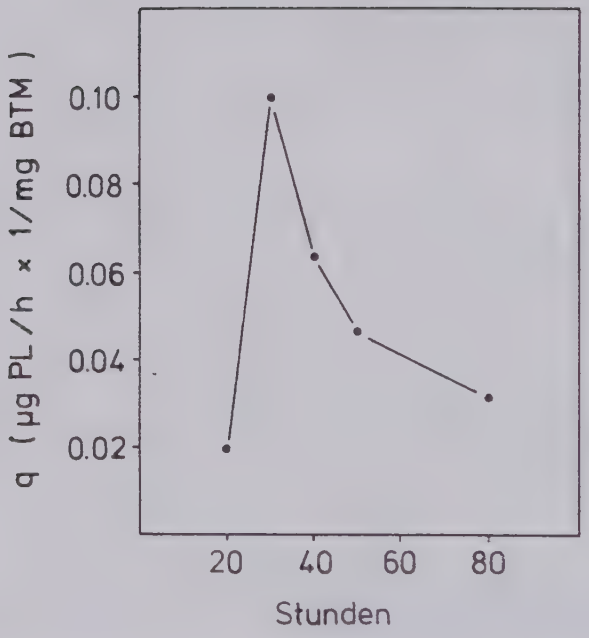


Abb. 15 :
Verlauf der spezifischen Produktbildungsrate (q) einer Minimalmedium-kultur von S.arenae TO'469.
Aufgetragen wurde ein exemplarischer Verlauf in einer 100 ml Kultur in 1000 ml Erlenmeyer Kolben (4 Schikanen), 30°C, und einer Schüttel-frequenz von 105 Upm. Das Maximum der spezifischen Produktbildungsrate lag in allen untersuchten Fällen zwischen 30 und 48 h Kulturzeit.

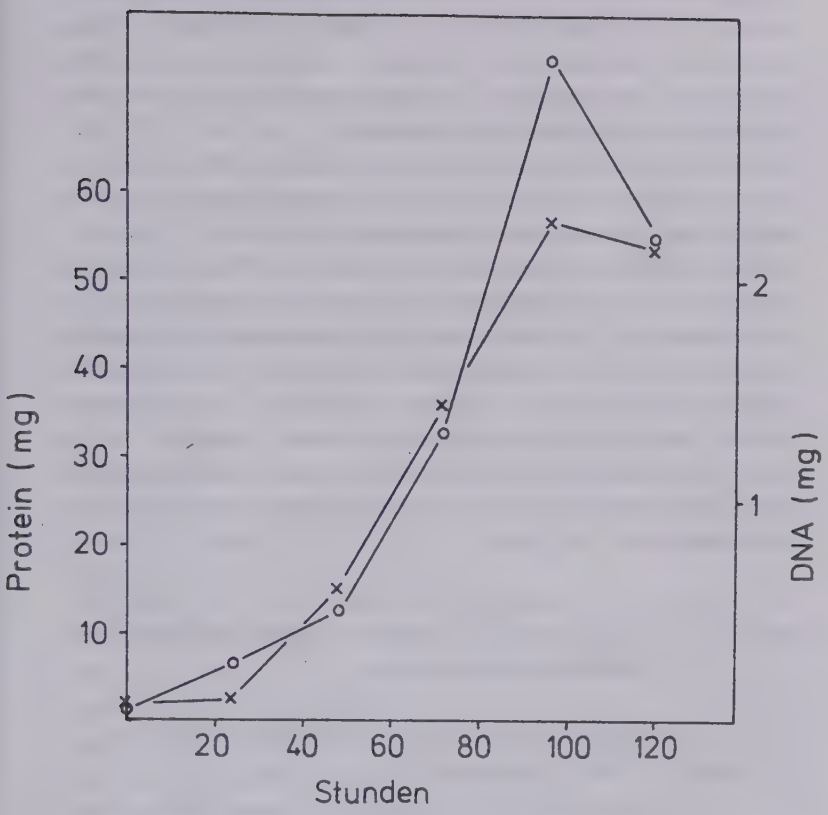


Abb. 16 :
Verlauf des Gehalts an DNA (- x -) und Protein (- o -) des Mycels einer Kultur (100 ml) in Minimalmedium nach Optimierung des Calcium- und Eisengehalts.

glichen mit den Werten in Minimalmedium wurden in komplexem Medium deutlich höhere Werte von 1.1% DNA und 29% Protein, bezogen auf das Trockengewicht, gefunden. Diese Ergebnisse dürften auf filamentösem Wachstum , auf homogenerem Zellinhalt und geringerem Anteil an Zellwandmaterial beruhen.

Aufgrund der Übereinstimmung von Trockengewicht und Zellwachstum war es möglich, gebildetes PL oder Substrat (siehe 3.4.3) in einen sinnvollen Bezug zum Trockengewicht zu setzen.

Leider sind die Trockengewichtsbestimmungen in Schüttelkulturen mit höherer Ungenauigkeit behaftet als z.B. die Bestimmung der PL-Konzentration. Deshalb wurde darauf verzichtet, die spezifische Produktionsrate q gegen die spezifische Wachstumsrate μ graphisch aufzutragen. Aus den Werten von Tab. 2 geht jedoch hervor, daß die spezifische Produktionsrate, gemessen an der spezifischen Wachstumsrate in Schüttelkulturen, keinen konstanten Wert besaß. Die PL-Bildung war optimal bei einer bestimmten Wachstumsrate.

Tabelle 2: Verhältnis der spezifischen Produktbildungsrate q zur spezifischen Wachstumsrate μ

Vergleich von 2 verschiedenen Kulturen in Minimalmedium nach Optimierung der Fe/Ca- Konzentration

1.	Kulturzeit (h)	q (μg PL/h x 1/mg)	μ (h^{-1})
	30	0.028	0.114
	40	0.077	0.031
	50	0.017	0.023
	60	0.015	0.023
2.	20	0.042	0.077
	40	0.077	0.041
	50	0.017	0.019
	80	0.015	0.011

3.2. Regulation der Pentalenolacton-Resistenz von S.arenae TÜ 469 über die Isoenzyme der GAPDH

Für den Produzenten eines Antibiotikums gibt es im wesentlichen drei Möglichkeiten, eine unerwünschte Wachstumshemmung durch das eigene Produkt zu vermeiden: Dies geschieht entweder durch enzymatische Inaktivierung des Produkts, durch Modifizierung des Wirkorts oder durch Permeationsbarrieren (26). In den Arbeiten von Pfeiffer (74) und Maurer (61) war gezeigt worden, daß S.arenae TÜ 469 unter PL-Produktionsbedingungen eine Pentalenolacton-insensitive GAPDH und in komplexen Medien eine PL-sensitive GAPDH besitzt, d.h. der Wirkort ist modifiziert. In beiden Arbeiten wurde Verfahren beschrieben, nach denen diese Isoenzyme gereinigt werden konnten. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden Pentalenolactonmenge und Inkubationszeit so optimiert (siehe 2.4.2.2), daß es auch in Isoenzymgemischen möglich war, beide Enzymaktivitäten mit Hilfe ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber PL getrennt zu bestimmen.
Die relative Sensitivität beider Isoenzyme wurde anhand der PL-Konzentration bestimmt, die bei 1 h Inkubationszeit nötig war, um 50% Inaktivierung des Enzyms zu bewirken. Die beiden Enzyme besaßen eine um den Faktor 1000 unterschiedliche Sensitivität, wobei das sensitive Enzym noch um den Faktor 100 schwerer hemmbar war als das Referenzenzym aus Kaninchenmuskel (siehe Tab. 3). Nach erfolgreicher Reinigung der Isoenzyme (siehe 2.4.8.1) war auch die Charakterisierung möglich: Das PL-sensitive Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 180 000 und besteht aus 4 Untereinheiten zu 43 000. Das PL-insensitive Enzym hat ein Molekulargewicht von 290 000 und besteht aus 8 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 36 000. Beide Enzyme haben den gleichen K_m-Wert für NAD, unterschieden sich aber in ihrem K_m-Wert für GAP, der 250 µM für das sensitive und und von 100 µM für das insensitive Enzym beträgt. Die spezifische Aktivität des gereinigten PL-sensitiven Enzmys war deutlich höher (112 U/mg) als die des PL-insensitiven Enzyms (33 U/mg).
Mit Hilfe des enzymatischen Tests wurde der zeitlich Verlauf der beiden Enzyme in Mycel bestimmt, das aus komplexem Medium auf

Tabelle 3: Abhängigkeit der Inaktivierung von GAPDH aus Kaninchenmuskel und S.arenae TÜ 469 von der Konzentration an Pentalenolacton-Chlorhydrin im Testansatz:

Es wurden 50 mU Enzymaktivität in den Test eingesetzt, Testvolumen 2.5 ml, 1 h Inkubation bei 21°C mit 100 µl PL-Lösung in 50% Methanol. Aufgeführt wurden die % Restaktivität nach Start der Reaktion mit 5mM Glycerinaldehyd-3-phosphat.

Konz. PL	0.42mM	42µM	4.2µM	0.42µM	42nM	4.2nM	0.42nM
KM-GAPDH	0%	0%	0%	0%	0%	14%	95%
PL-ins. GAPDH	0%	84%	99%	99%	95%	95%	100%
PL-sens. GAPDH	0%	0%	0%	7%	30%	67%	100%

Tabelle 4:
Zeitlicher Verlauf der PL-Resistenz in gemeinsamen Inkubationen von Rohextrakt aus Minimalmediumkulturen von S.arenae TO 469 mit gereinigter, PL-sensitiver GAPDH aus dem gleichen Organismus in Tris/Cl pH 8.0, 5mM EDTA, 5 mM Mercaptoäthanol. Die Enzymlösungen wurden in verschiedenen Volumenverhältnissen gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 20°C. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Inaktivierung eines Aliquots des Testgemischs im enzymatischen Test durch 42 nM PL getestet. Diese PL-Konzentration führt nicht zu einer vollständigen Inaktivierung der PL-sensitiven GAPDH aus S.arenae TO 469 (siehe Tab. 5).
RE MM = Rohextrakt Minimalmedium, % RA = % Restaktivität nach PL-Zugabe

	Inkubationszeit							
	0 h		22 h		45 h		72 h	
	Vol-Akt.	% RA	Vol-Akt.	% RA	Vol-Akt.	% RA	Vol-Akt.	% RA
RE MM	2.0	110	1.7	99	1.6	113	1.5	99
PL-sens.GAPDH	1.0	27	0.67	40	0.57	30	0.4	34
PL-sens.GAPDH: RE MM 1:1	1.7	65	1.3	86	1.3	76	1.2	70
PL-sens.GAPDH: RE MM 10:1	1.2	59	1.1	47	1.0	34	0.8	47
PL-sens.GAPDH: RE MM 100:1	1.1	28	0.8	21	0.8	30	0.67	38

Minimalmedium überimpft wurde (siehe Abb. 17). Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß das sensitive Enzym in Minimalmedium zu Beginn der Kultur ein Maximum seiner spezifischen Aktivität aufweist, bevor es durch insensitives Enzym ersetzt wird, das nicht die gleiche Höhe der spezifischen Aktivität erreicht.
Im weiteren sollte nun geklärt werden, ob durch Proteasewirkung eine Interkonversion der Untereinheit des sensitiven Enzyms zur kleineren Untereinheit des insensitiven Enzyms möglich wäre. Alternativ hierzu muß mit der Möglichkeit der Exprimierung eines zweiten Gens für die PL-insensitive GAPDH gerechnet werden.

Um die Hypothese einer Interkonversion zu überprüfen, wurden die folgenden Experimente durchgeführt: Es wurde die Sensitivität gereinigten, sensitiven Enzyms nach Inkubation mit einem Rohextrakt von Protein aus Minimalmediumkulturen überprüft. Außerdem wurde der Einbau von ^{14}C-Glycin in die Proteinbande PL-insensitiver GAPDH zum Zeitpunkt des Auftretens dieses Isoenzyms getestet. Darüber hinaus wurde auch die Hemmbarkeit der Bildung PL-insensitiver GAPDH durch Zugabe von Chloramphenicol untersucht.

Bei Annahme einer Interkonversion durch spezifische proteolytische Enzyme, müßten diese im Homogenat von Zellen nachzuweisen sein, die am Beginn der PL-Produktion stehen. Hierzu wurde Mycel aus einer 40 h Kultur in Minimalmedium entnommen, aufgeschlossen und über Nacht gegen Tris-Puffer dialysiert, um PL zu entfernen. Anschließend wurde das dialysierte Homogenat in unterschiedlichen Volumenverhältnissen mit gereinigtem, sensitivem Enzym gemischt und bei 20°C inkubiert. Im Verlauf mehrerer Tage wurde nun die PL-Hemmbarkeit der Ansätze mit den Kontrollen verglichen. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, konnte keine Steigerung der PL-Resistenz im Inkubationsgemisch festgestellt werden.

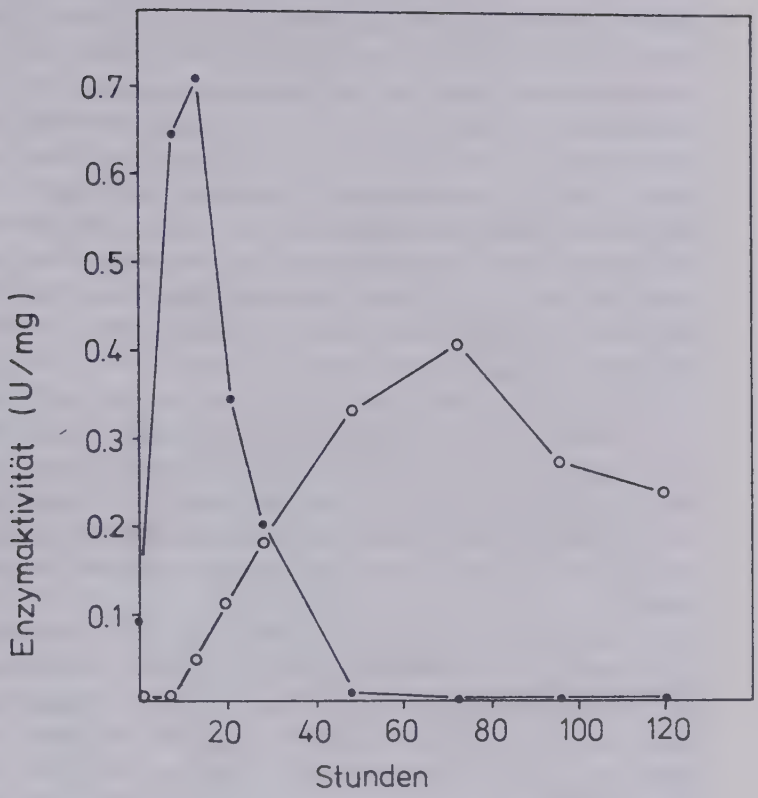


Abb. 17 :
Verlauf der spezifischen Aktivität von PL-sensitiver GAPDH (- ● -) und PL-insensitiver GAPDH (- ○ -) von S.arenae TO 469 während einer Kultur in Minimalmedium nach Inokulation mit 1 ml Kultur aus komplexem Medium
Die beiden Isoenzyme wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber PL im enzymatischen Test bestimmt.

In einem weiteren Versuch sollte festgestellt werden, ob ein Einbau von ^{14}C-Glycin in die Proteinbande der PL-insensitiven GAPDH erfolgt, wenn die Aminosäure 8 h nach Inokulation von Minimalmedium mit Zellen aus komplexem Medium zugegeben wird.
Der Gehalt an ^{14}C in CO_2, Kulturfiltrat, zellfreiem Extrakt und Zellwandmaterial wurde über 72 h in Aliquoten der Kultur bestimmt. Gleiche Proteinmengen der Rohextrakte wurden über SDS-Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und die Radioaktivität der Proteinbanden über Autoradiographie des getrockneten Gels bestimmt. Bei der Bilanzierung der Radioaktivität fiel auf, daß der Gehalt von ^{14}C im Rohextrakt während 64 h stetig abnahm, während der Anteil in CO_2 zunahm und nach 64 h 75% des ^{14}C als unlösliches Zellmaterial vorlag. Bei Betrachtung von Gel und Autoradiogramm war zum Zeitpunkt 24 h eine weitgehende Übereinstimmung von Radioaktivität und Proteinbanden festzustellen, wobei auch die Bande der PL-insensitiven GAPDH bereits zu erkennen war. Nach 48 h war die Bande der PL-insensitiven GAPDH neben ca. 14 anderen Proteinbanden eine der herausragend markierten Proteinbanden.
Auch dieser Versuch erbrachte somit eher Hinweise auf eine GAPDH-Neusynthese als auf eine Interkonversion, bei der eine fehlende oder geringe Markierung der Proteinbande der PL-insensitiven GAPDH erwartet worden wäre. Außerdem ergaben sich damit auch deutliche Hinweise auf eine relativ große Stabilität der PL-insensitiven GAPDH.

Der zeitlich Verlauf der PL-Sensitivität von Mycel, das aus komplexem Medium in Minimalmedium mit 40µg Chloramphenicol/ml ist aus Tab. 5 ersichtlich. Die spezifische Aktivität der GAPDH blieb während 24 h konstant und nahm anschließend ab. Sie war bis zu 40 h vollständig PL-hemmbar. Durch Chloramphenicol wurde folglich eine Bildung PL-insensitiver GAPDH verhindert.
Nach Inaktivierung PL-sensitiver GAPDH-Aktivität in Mycel, das in komplexem Medium angezogen worden war, wurde in den untersuchten

Kulturen anschließend die Bildung PL-insensitiver GAPDH beobachtet (62). Auch die Bildung dieser insensitiven Enzymaktivität konnte durch anschließende Zugabe von Chloramphenicol unterbunden werden.

Tabelle 5:
Spezifische Aktivität und PL-Sensitivität von GAPDH in den Zellen von S. arenae TO 469, die von Wickerham Medium auf Minimalmedium (nach 116) mit 40 µg /ml Chloramphenicol umgesetzt wurden

Zeit in MM (h)	spez.Akt. (U/mg)	% Hemmung
0	0.64	99%
15	0.43	100%
24	0.78	99%
40	0.17	100%

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen der Nachweis einer Interkonversion PL-sensitiver GAPDH in die insensitive Form nicht zu erbringen war, sollte im weiteren das Ausmaß der Homologie von PL-sensitiver und insensitiver Form durch partielle Proteolyse und anschließende Auftrennung über Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht werden. Als Vergleichsenzyme standen außerdem handelsübliche Präparationen von GAPDH aus Kaninchenmuskel und Hefe zur Verfügung. Durch Einsatz relativ spezifischer Proteasen und kurze Proteolysezeiten sollte versucht werden, eine begrenzte Anzahl von Peptidbruchstücken zu erhalten. Als Proteasen wurden Papain und Clostripain eingesetzt. Papain spaltet bevorzugt Peptidbindungen, an denen basische Aminosäuren sowie Leucin und Glycin beteiligt sind. Clostripain spaltet Peptidbindungen auf der Carbonyl-Seite der Aminosäure Arginin. Nach Proteolyse (siehe 2.4.8.2) wurden die Ansätze auf Acrylamidgelen aufgetrennt und verglichen (siehe Abb. 18).

Beim Verdau mit Papain zeigten die beiden Enzyme aus dem Streptomyceten eine weitgehende Übereinstimmung der Proteinbanden. Es konnte nur eine zusätzliche Proteinbande geringeren Molekulargewichts bei den Bruchstücken der PL-insensitiven GAPDH nachgewiesen werden (siehe Abb. 18). Da die Bruchstücke infolge ihrer geringen Größe nicht gut getrennt wurden, kann die Existenz eines entsprechenden, größeren Peptids im Ansatz der PL-sensitiven GAPDH nicht ausgeschlossen werden. Im Vergleich mit den Enzymen aus Muskel und Hefe ergaben sich dagegen sehr viel größere Unterschiede.

Bei Proteolyse mit Clostripain, die nach Denaturierung mit Jodacetat durchgeführt wurde, waren die Ergebnisse nicht so eindeutig. Unter Berücksichtigung der geringeren Mengen an eingesetztem PL-insensitiven Enzym wurden beim Vergleich der proteolytischen Ansätze dem PL-insensitiven Enzym entsprechende Peptide sowohl beim PL-sensitiven Enzyms aus S.arenae Tü 469 als auch bei der GAPDH aus Kaninchenmuskel gefunden. Hieraus kann geschlossen werden, daß das PL-sensitive Enzym stärkere Homologie mit dem Enzym aus Kaninchenmuskel aufweist, als das insensitive. Aufgrund der Homologie der Streptomycetenenzyme untereinander kann spekuliert werden, daß die beiden Isoenzyme durch Genverdopplung aus-

Abb. 18 a:
Elektrophoretische Auftrennung von GAPDH nach proteolytischer Umsetzung mit Papain (siehe 2.4.8.2)
Die Elektrophorese erfolgte in 0.7 mm Acrylamidgelen (15%). Die Anfärbung der Proteine wurde mit Coomassie Blue durchgeführt.

A ger. PL-sensitive GAPDH aus S.arenae vor der Umsetzung
B ger. PL-insens. GAPDH aus S.arenae vor der Umsetzung
C GAPDH aus Kaninchenmuskel
1 PL-sens. GAPDH aus S.arenae nach Proteolyse mit Papin
2 PL-insens. GAPDH aus S.arenae nach Proteolyse mit Papain
3 GAPDH aus Kaninchenmuskel nach Proteolyse mit Papain

Abb. 18 b:
Elektrophoretische Auftrennung von GAPDH nach proteolytischer Umsetzung mit Clostripain (siehe 2.4.8.2)
Die Elektrophorese erfolgte in 0.7 mm Acrylamidgelen (15%).
Die Anfärbung der Proteine wurde mit Coomassie Blue durchgeführt.

1 GAPDH aus Kaninchenmuskel nach Behandlung mit Clostripain
2 GAPDH aus Hefe nach Behandlung mit Clostripain
3 PL-insens. GAPDH aus S.arenae nach Behandlung mit Clostripain
4 PL-sens. GAPDH aus S.arenae nach Behandlung mit Clostripain

einander hervorgegangen sind.
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich aus den Ergebnissen keine Anhaltspunkte für eine mögliche Interkonversion der beiden Streptomycetenenzyme ergaben.
Mit Hilfe des Enzymtests wurden ferner die GAPDH-Aktivität und PL-Sensitivität anderer Streptomycetenstämme nach Anzucht in verschiedenen zur PL-Produktion beschriebenen Medien und in den Kulturmedien von S.arenae bestimmt und mit den Werten von S.arenae verglichen. Es zeigte sich hierbei, daß alle untersuchten Streptomyceten, die kein PL bildeten, unter allen untersuchten Kulturbedingungen eine PL-sensitive GAPDH besaßen. S.arenae TÜ 469 und S.roseogriseus DSM 40 488 wiesen eine PL-insensitive GAPDH auf, sobald eine PL-Bildung nachgewiesen werden konnte. Diese erfolgte bei S.roseogriseus auch während der Wachstumsphase in komplexem Medium!

Außerdem wurde ein HPLC-System zur Detektion von GAPDH-Isoenzymen anhand der Elution von DEAE-Polyol entwickelt. Hiermit wäre eine schnelle Präparation der Isoenzyme und die Analyse von Enzymgemischen möglich gewesen. Leider erwiesen sich die Enzyme aus S.arenae TÜ 469 als sehr viel instabiler als eukaryontische GAPDH, so daß auf eine derartige Analysenmethode vorerst verzichtet werden mußte.

3.3 Produktion von Pentalenolacton in Abhängigkeit von der Medienzusammensetzung

3.3.1 Abhängigkeit der PL-Produktion von der Mineralsalzkonzentration in Minimalmedium

Bei vielen Streptomycetenstämmen ist eine ausgeprägte Abhängigkeit der Antibiotikaproduktion vom Mineralsalzgehalt des Kulturmediums beschrieben worden (112). Aus diesem Grund schien es sinnvoll, das auf Kohlenstoff- und Stickstoffquellen für die PL-Produktion von Streptomyces arenae TÜ 469 optimierte Medium (116) auch in bezug auf seinen Salzgehalt zu optimieren.
Calcium wird in Kulturmedien oft in Form von $CaCO_3$ zur Pufferung zugesetzt, und es ist kaum ein Effekt auf die Produktion von Sekundärmetaboliten bekannt. Dagegen scheint dem Calciumtransport eine Bedeutung bei der Sporenbildung und Sporenauskeimung zuzukommen (89,102). Außerdem scheint Calcium die Permeabilität bakterieller Membranen zu beeinflussen. Die Calciumkonzentration wurde im Minimalmedium nach Zdunek (116) im Bereich zwischen 0 und 70 mM variiert und das Zellwachstum und die PL-Produktion bestimmt. Es ergab sich ein optimaler Bereich für die PL-Synthese bei 27 mM $CaCl_2$ (siehe Abb. 19). Das Zellwachstum besaß ebenfalls ein Maximum in diesem Konzentrationsbereich. Es kann deshalb vermutet werden, daß die Produktionssteigerung weniger ein spezifischer Effekt auf die PL-Produktion ist, sondern vielmehr auf einer allgemeinen Wachstumssteigerung beruht.

Bei Variation des Gehalts an Zinksulfat im Produktionsmedium konnte im Bereich zwischen 35 und 175 mM kein Unterschied in der PL-Produktion festgestellt werden. Ohne Zusatz von Zinksulfat sank die Produktion auf 5% ab, womit die grundsätzliche Abhängigkeit der PL-Produktion von S.arenae TÜ 469 von Zinkionen nachgewiesen war. Im Gegensatz zur PL-Bildung zeigte das Myceltrockengewicht keine Abhängigkeit von Zinksalzen.

Die Zugabe von 0.05 g/l $CoCl_2$ x 6 H_2O und 0.005 g/l MoO_4 x 2 H_2O nach Bushell und Fryday (12) blieb ohne Einfluß auf die PL-Bildung.

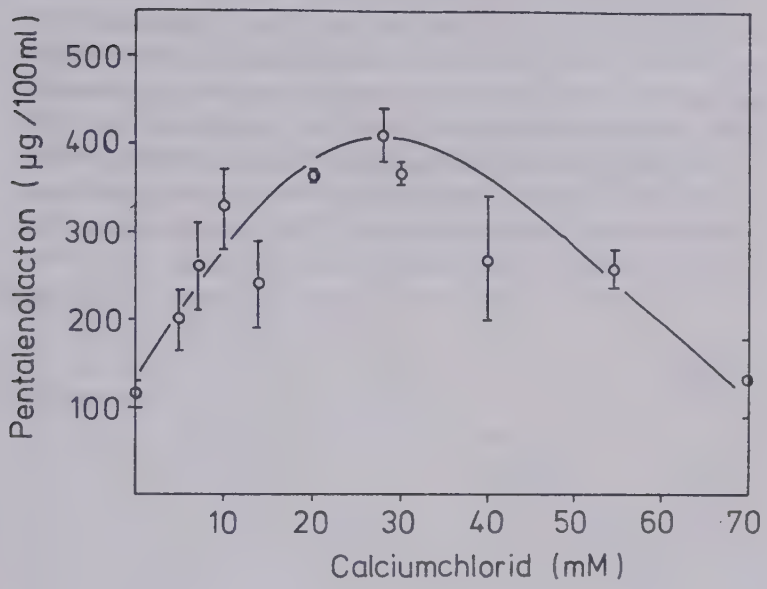


Abb 19 :
Abhängigkeit der Pentalenolactonproduktion von S. arenae TÜ 469 von der Calciumchloridkonzentration in Minimalmedium nach Zdunek (116) (71 µM an $FeSO_4$, 35 µM an $ZnSO_4$).
Die maximale Produktion von jeweils zwei identischen Kulturen wurde bestimmt und zusammen mit dem Mittelwert aufgetragen.

Nach Weinberg (112) kommt bei der Gattung Streptomyces der Konzentration von Eisen im Kulturmedium eine wesentliche Bedeutung bei der Kontrolle des Sekundärmetabolismus zu. Es sind Beispiele sowohl hemmender, wie auch stimulierender Wirkung von Eisensalzen bekannt. Bei Variation des Gehalts an $FeSO_4$ zwischen 0 und 1 mM in Minimalmedium zeigte sich sowohl eine Steigerung des Wachstums als auch der PL-Produktion mit zunehmender Eisensulfatmenge (siehe Abb. 20). Das Verhältnis von 900 µg PL/mg Trockengewicht blieb hierbei annähernd konstant. Eine Konzentration von 100 mg $FeSO_4 \times 7H_2O$ wurde als optimal angesehen. Nach Abschluß der Optimierung der Mineralsalzkonzentrationen wurde das Minimalmedium in einer Zusammensetzung verwendet, in der Calciumchlorid 27.5 mM und Eisensulfat 0.36 mM waren. Mit diesem modifizierten Minimalmedium wurden die enzymatischen Untersuchungen zur Biosynthese und Regulation von PL unter 3.4 - 3.5 durchgeführt.

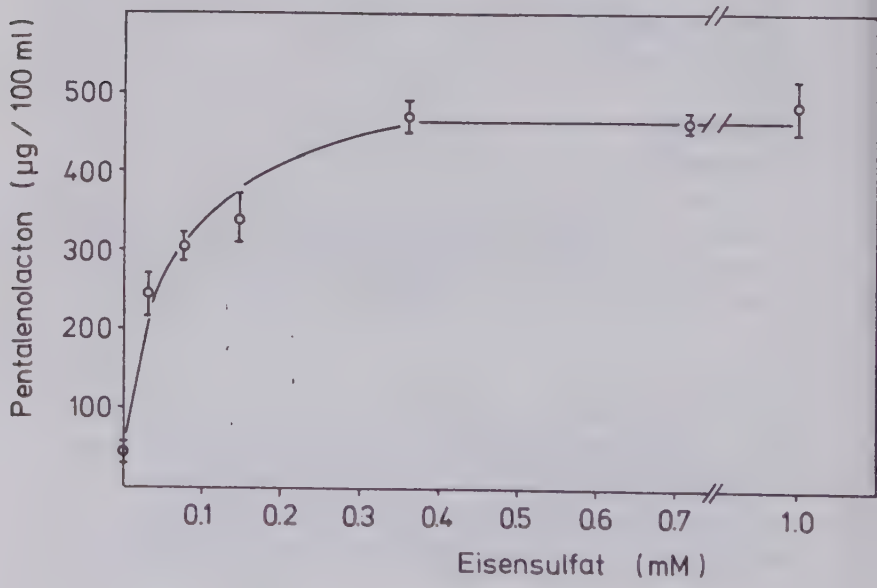


Abb. 20:
Abhängigkeit der Pentalenolactonproduktion von S.arenae TÜ 469 von der Eisensulfatkonzentration in Minimalmedium (27.5 mM $CaCl_2$) Die maximale PL-Produktion von jeweils zwei identischen Kulturen wurde zusammen mit dem Mittelwert aufgetragen.

3.3.2 Verwertung von Mannit

Bei einer 4000 l Fermentation wurde die bei Fermentationsabbruch noch im Kulturfiltrat vorhandene Mannitkonzentration bestimmt. Hierbei wurden mit dem Mannit Dehydrogenase Test noch 13.9 g/l nachgewiesen, was 30% der eingesetzten Mannitmenge entspricht. Es sollte deshalb, nicht zuletzt aus wirtschaftlichen Gründen, die Abhängigkeit der PL-Produktion von der eingesetzten Mannitmenge in Schüttelkulturen ausgetestet werden. Aus Abb. 21 geht hervor, daß Mannit bis zu einer Konzentration von 30 g/l den limitierenden Faktor der PL-Produktion darstellt. Die auf Mannit bezogene, spezifische Ausbeute ist unter diesen Bedingungen konstant. Bei weiterer Erhöhung der Mannitmenge wurde keine Steigerung der Produktion von Pentalenolacton beobachtet.
Daraus folgt, daß S.arenae TÜ 469 die maximale PL-Bildung auch in Minimalmedium aufweist, das 25% weniger Mannit enthält als das ursprünglich verwendete Medium (116).

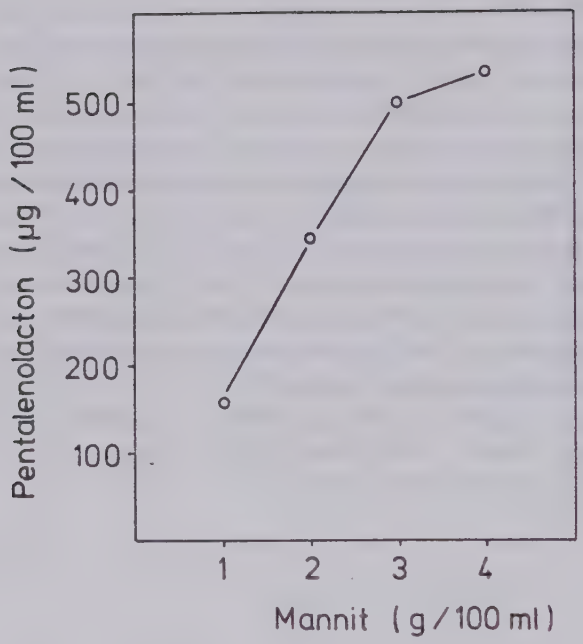


Abb. 21 :
Abhängigkeit der Pentalenolactonproduktion von S.arenae TÜ 469 von der Mannitkonzentration in Minimalmedium mit 27.5 mM Calciumchlorid und 0.36 mM Eisensulfat.
Die maximale PL-Produktion nach 96 h Kultur in Minimalmedium mit unterschiedlichem Mannitgehalt wurde aufgetragen.

3.3.3 Verwertung anderer Kohlenstoff- und Stickstoffquellen

Streptomyces arena TÜ 469 muß der Theorie der PL-Biosynthese zufolge in der Lage sein, in unpolare Verbindungen, wie es das Pentalenen darstellt, Sauerstoff einzuführen und diese Verbindun-

gen weiter zu verstoffwechseln. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit der Stamm in der Lage ist, auf unpolaren C-Quellen zu wachsen bzw. diese zur Produktion von PL zu verwenden. Als derartige C-Quellen wurden Paraffine, Hexadekan, Squalen und Cholesterin untersucht; mit Ausnahme von Squalen konnte kein Wachstum auf diesen Verbindungen als alleiniger C-Quelle festgestellt werden. Mit Squalen als C-Quelle war das beobachtete Wachstum nur geringfügig vermindert, dagegen war die Bildung von PL beinahe vollständig unterbunden. Auch nach Zugabe von 1% Squalen zu modifiziertem Minimalmedium wurden nur 10 - 30% der PL-Menge der Kontrollkultur ohne Squalen nachgewiesen. Wird ein Vergleich der Trockengewichte von Kulturen auf Squalen mit Kulturen vorgenommen, die - wie bereits früher untersucht (116) - auf Ölsäure oder Stearinsäure angezogen wurden, so fällt auf, daß das Wachstum in allen Fällen etwas geringer war als bei Kulturen, die auf Mannit agezogen wurden. Als Ursache hierfür kann entweder die Möglichkeit geringerer Sauerstoffeintragsgeschwindigkeit (43) oder Detergentienwirkung diskutiert werden.

Noch stärker als auf das Zellwachstum wirkten sich derartige C-Quellen, soweit sie verstoffwechselt werden konnten, auf die Produktion von PL aus. Die Produktion wurde durc lipophile C-Quellen z.T. vollständig gehemmt (siehe auch Abb.23).

Neben diesen Untersuchungen mit verschiedenen C-Quellen wurde die PL-Produktion von S.arenae TÜ 469 auch mit komplexen Stickstoffquellen untersucht. Als N-Quelle diente hierbei in erster Linie Sojamehl, das im Medium nach Bushell und Fryday (12) und in Medien, die von Aizawa (2) und Sobin (98) als PL-Produktionsmedien beschrieben worden waren, verwendet wird. In diesen Medien war die PL-Produktion von S.arenae TÜ 469 gegenüber der Kultur in Minimalmedium vermindert, oder sie erfolgte erst gegen Ende des Zellwachstums. Außerdem war in diesen Fällen die spezifische PL-Bildung von S.arenae deutlich geringer als in definiertem Medium. Beim Vergleich mit dem als PL-Produzenten beschriebenen S. roseogriseus DSM 40 488 (98) zeigte sich, daß dieser Stamm auch in komplexen Medien während der Wachstumsphase eine PL-Produktion aufwies, die im Medium nach Sobin et al. (97) Werte um 11 mg/l erreichte (siehe Abb. 22).

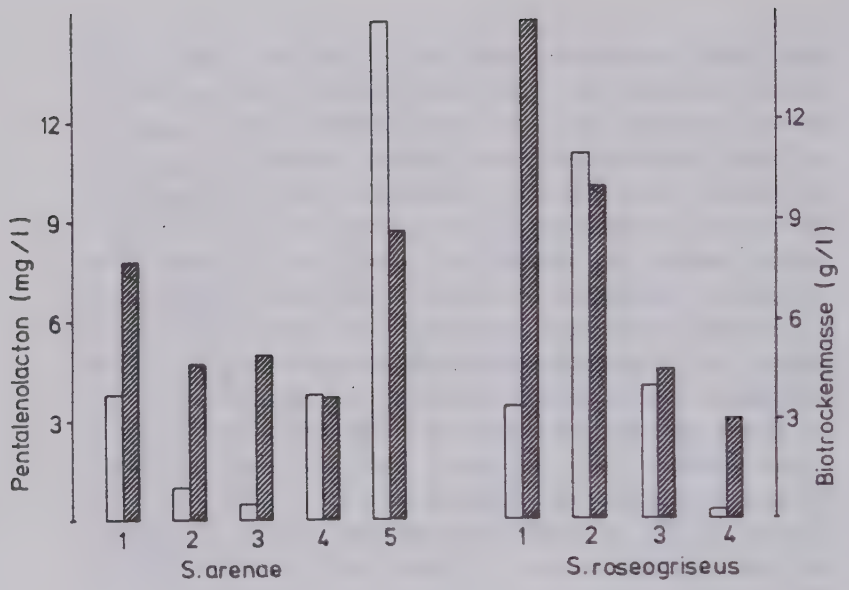


Abb. 22:

PL-Produktion und grbildete Trockenmasse von S.arenae TO 469 und S.roseogriseus (DSM 40 488, ATCC 12 414) in verschiedenen Medien, die zur PL-Produktion beschrieben sind.

Die maximale PL-Bildung (□) und maximale Zelltrockengewichte (▨) in den verschiedenen Medien wurden gegeneinander aufgetragen.

1 = Medium nach Aizawa (2)

2 = Medium nach Sobin (98)

3 = Wickerham Medium

4 = Minimalmedium nach $CaCl_2$-Optimierung

5 = Minimalmedium nach Abschluß der Optimierungsversuche

3.3.4 Produktion von PL nach Verfütterung von Vorstufen der Pentalenolacton-Biosynthese

Da die Biosynthese von Pentalenolacton über HMG-CoA und den Mevalonsäureweg verläuft, sollte versucht werden , ausgehend von Acetat oder langkettigen Fettsäuren (116), die auftretenden Vorstufen der Isoprenoide zu verfüttern und in ihrer Wirkung auf die PL-Bildung zu untersuchen. Da die meisten Vorstufen in mehrfach geladener Diphosphatform oder als Coenzym-A-Verbindung vorliegen, mußte davon ausgegangen werden, daß diese Verbindungen nur schwer durch die Cytoplasmamembran transportiert werden können. Dadurch war die Zahl möglicher Vorstufen stark eingeschränkt, soweit nicht besondere Möglichkeiten beschrieben waren, geladene Vorstufen in die Zelle zu transportieren (105). Auf die Verfütterung von Leucin und Ketoisocapronsäure als möglichen Vorstufen des Sesquiterpenwegs in S.arenae TÜ 469 wird an anderer Stelle eingegangen (siehe 3.3.6). Um zu verhindern, daß der vermutlich bevorzugte Einbau der Vorstufen in Menachinon und Undecaprenylphosphat-Carrier einen Einbau in PL verdeckt, wurden die Vorstufen mit Ausnahme von Natriumacetat nach 48 bis 60 h Kultur in Minimalmedium zugegeben oder zu Mycel unter Resting cell Bedingungen supplementiert.

Untersucht wurde PL-Produktion und Zellwachstum nach Verfütterung von Natriumacetat, Mevalonsäure, Isoprenoiddiphosphate in Kombination mit Magnesiumsalzen und Humulen Außerdem wurde der Einbau von ^{14}C-Pentalenen untersucht. Nachdem Acetat in Konzentrationen zwischen 10 und 100 mM nur zu einer Wachstumshemmung geführt hatte, wurde versucht die Verstoffwechslung von Natriumacetat durch Supplementierung mit Mevalonsäure zu steigern. Auch dieser Versuch blieb ohne Erfolg; Natriumacetat wirkt in einer Konzentration von 100 mM sogar in Minimalmedium mit Mannit als Wachstumshemmer. Obwohl das Wachstum mit geringeren Mengen Natriumacetat nur teilweise gehemmt war, konnten nur Spuren von PL im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Die GAPDH von S.arenae war jedoch auch unter diesen Bedingungen PL-insensitiv.

Mevalonsäure wurde in einer Konzentration von 30 mM einer Minimalmediumkultur nach 48 h steril zugegeben und die PL-Bildung im Vergleich mit einer Kontrollkultur bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied in der gebildeten Antibiotikamenge. Da Cane (15) den mangelnden Einbau von ^{13}C-Mevalonsäure in die Pentalenolactone aus Streptomyces UC 5319 bereits beschrieben hatte, wurde darauf verzichtet, zu untersuchen, ob Mevalonsäure in die Zelle aufgenommen werden kann. Auch unter Resting cell Bedingungen war kein Unterschied zu Kontrollkulturen festzustellen.

Dimethylallylalkohol und Isopentenol in nicht phosphorylierter Form wirkten bis 1% toxisch auf S.arenae TÜ 469, in einer Konzentration von 0.1% blieben sie ohne Wirkung auf die PL-Produktion.

Nach Takatsuji (105) wurde außerdem versucht, Isopentenylpyrophosphat, Geranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat als Magnesiumsalze in die Zellen zu transportieren. Dem beschriebenen Experiment zufolge war es auf diese Weise möglich, Isoprenoidpyrophosphate durch die Membran von Bakterien zu transportieren, die auf Mevalonsäure als C-Quelle wachsen können. Da sich nach Supplementierung der Diphosphate in einer Konzentration von 70 µM (IPP), 350 µM (GPP), 110 µM (FPP) und 3.2 mM $MgSO_4$ zu einer 48 h Minimalmedienkultur weder bei der PL-Bildung noch in den untersuchten Enzymaktivitäten oder den Trockengewichten Unterschiede im Vergleich mit einer Kontrollkultur ergaben, wurde versucht, die Aufnahme der Diphosphate in die Zelle nachzuweisen. Hierzu wurde eine 20 ml Minimalmediumkultur mit ^{14}C-IPP und $MgSO_4$ inkubiert und der Einbau der Radioaktivität kontrolliert. Das Ergebnis bestätigte die Vermutung, daß die Pyrophosphate auch in Verbindung mit Magnesiumsalzen nicht in die Zellen von S.arenae TÜ 469 aufgenommen werden können.

Bei der dünnschichtchromatographischen Analyse des Kulturfiltrats des nicht-radioaktiven Verfütterungsexperiments mit Pyrophosphaten konnte auch in der Kontrollkultur eine Pyrophosphatverbindung nachgewiesen werden, die offensichtlich von S.arenae TÜ 469 gebildet und ins Medium abgegeben wird. Anhand des R_f-Werts konnte ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um Polyphosphat handelt, das häufig bei Streptomyceten gebildet wird. Eine Identifizierung wurde nicht versucht.

Humulen stellt zwar ebenfalls eine Vorstufe von PL dar, die jedoch als Übergangsverbindung bei der Farnesylpyrophosphat-Zyklase nach Cane (17) aus sterischen Gründen nicht aus ihrer Enzymbindung freigesetzt werden darf. Gerade aus diesem Grund schien es interessant zu sein, die PL-Bildung einer Kultur nach Humulenzugabe zu untersuchen. Bei Supplementierung von 300 µl Humulen zu Minimalmedienkulturen wurde eine maximale PL-Bildung von ca. 10% der Kontrolle gemessen. Dagegen erreichte das Trockengewicht der Zellen 75% der Kontrolle. Dies bedeutete eine drastische Minderung der PL-Bildung statt der erwarteten Steigerung. Da die Bildung von Zelltrockenmasse nach Humulenzugabe nur in geringem Maß vermindert war, konnte eine unspezifische Wirkung auf das Zellwachstum weitgehend ausgeschlossen werden. Um aufzuklären, ob Humulen verstoffwechselt worden war, wurden Zellen und Kulturfiltrat nach Abschluß des Verfütterungsexperiments mit Chloroform extrahiert und der eingeengte Chloroformextrakt mittels HPTLC analysiert. Hierbei konnte nachgewiesen werden, daß Humulen nach dem Experiment in einem weit größeren Maß in Form oxygenierter Verbindungen vorlag, als dies in der Ausgangssubstanz der Fall war. Eine Strukturaufklärung der gebildeten Humulenoxide wurde nicht vorgenommen. Diese Humulenoxide besitzen vermutlich oberflächenaktive Eigenschaften, die wiederum für das verminderte Wachstum der Zellen verantwortlich sein könnten.

Nach den vorangegangenen Experimenten (siehe hierzu Abb. 23) wäre es nun von besonderem Interesse gewesen, die PL-Bildung in Abhängigkeit von verfüttertem Pentalenen zu bestimmen. Da Pentalenen allerdings nur in geringen Mengen und mit hohem Aufwand synthetisiert werden konnte, mußte hierauf verzichtet werden. Da beim enzymatischen Test der Farnesylpyrophosphat-Zyklase ^{14}C-markiertes Pentalenen gebildet und abgetrennt wurde, sollte der Einbau radioaktiv markierten Pentalenens untersucht werden. 5 mg Pentalenen (6000 cpm) wurden zu einer 72 h Kultur in Minimalmedium supplementiert, die Kultur wurde 24 h später mit Phosphorsäure angesäuert und die Zellen und das Kulturfiltrat mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphase wurde getrocknet, eingeengt und über analytische HPLC aufgetrennt. Nach Bilanzierung der ausge-

zählten Radioaktivität in Tab. 6 zeigte sich, daß 50% der Radioaktivität mit Chloroform nicht aus den Zellen extrahierbar waren und nur 20% der gesamten Radioaktivität in der Chloroformphase vorlagen.

Tabelle 6: Bilanzierung der ^{14}C-Pentalenenverfütterung:

5 mg Pentalenen (6000 cpm) wurden einer 72 h Kultur zugesetzt. Nach 24 h wurden die Zellen und das Kulturfiltrat mit $CHCl_3$ extrahiert und jeweils ein Aliquot mit 5 ml Triton-Toluol-Szintillator ausgezählt.

Fraktion:	cpm
CO_2	370
Zellen	2400
Kulturfiltrat wssrg.Phase	1500
$CHCl_3$-Phase	1000

Nur ein kleiner Teil der Radioaktivität der Chloroformphase (ca.10%) konnte aufgrund der Elution von der HPLC-Säule bisher bekannten PL-Derivaten zugeordnet werden. Daraus folgt, daß ausgehend von Pentalenen entweder noch andere als die bisher bekannten Verbindungen gebildet werden, oder daß die PL-Synthese aus Pentalenen derart schnell erfolgt, daß nach 24 h bereits in Mehrzahl Abbau- und Folgeprodukte von PL vorlagen. Im GAPDH-Test zeigten diese Produkte keine Hemmaktivität. Hieraus kann allerdings nicht geschlossen werden, daß sie keine biologische Aktivität besitzen.

Aus diesen Versuchen zur Verfütterung von Vorstufen ging folglich hervor (siehe Abb. 23), daß die supplementierten Vorstufen nicht zu einer Steigerung der PL-Bildung führten, sofern sie überhaupt verstoffwechselt werden konnten. Außerdem scheint der Stoffwechselweg, der ausgehend von Pentalenen zur Bildung von PL führt, möglicherweise komplexer zu sein, als bisher angenommen wurde, da auch Cane und Tillman Einbauraten von 1 - 3% von $^{3}H/^{14}C$-Pentalenen in PL-Derivate fanden (18).

Die Hemmung der PL-Bildung durch Humulen muß vermutlich im gleichen Zusammenhang diskutiert werden wie die Hemmung durch Squalen. Hierbei schien es zunächst erforderlich, die Wirkung dieser Verbindungen auf die Aktivität der entscheidenden Enzyme der PL-Biosynthese zu untersuchen.

Da die bis dahin untersuchten Vorstufen bis zum Humulen nicht in die Zellen aufgenommen wurden oder nach Aufnahme nicht meßbar in Sesquiterpene von S.arenae eingebaut wurden, wurde i.a. darauf verzichtet, die Wirksamkeit dieser Verbindungen unter Resting cell Bedingungen zu untersuchen. Soweit dies erfolgte (z.B. bei der Mevalonsäure) konnte keine Differenz zu Kontrollkulturen beobachtet werden.

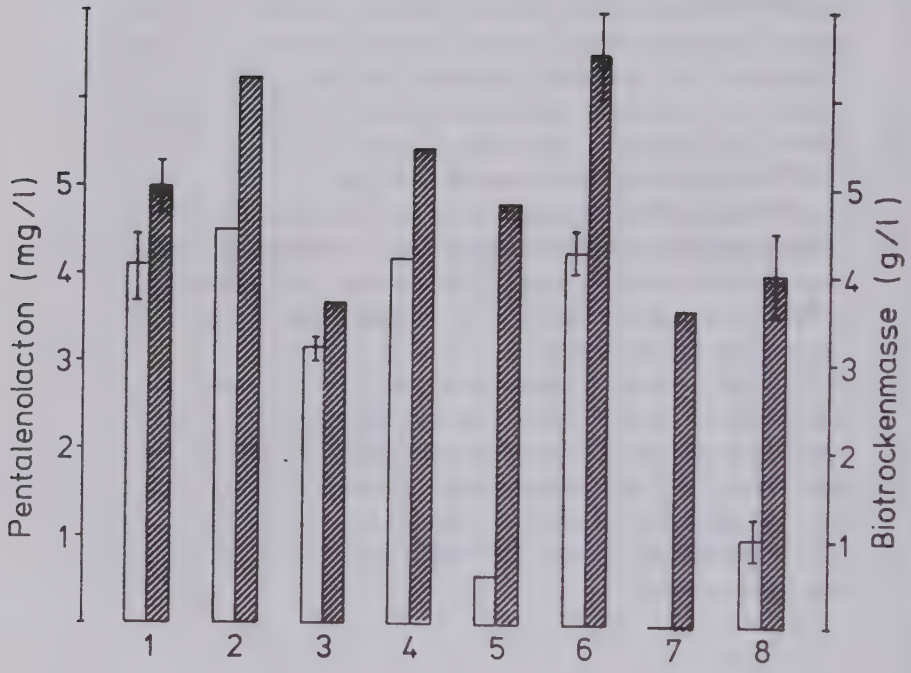


Abb. 23 :
Abhängigkeit von PL-Bildung und gebildetem Zelltrockengewicht von der Zugabe von potentiellen Vorstufen der PL-Synthese zu Minimalmedium.
Das Medium wurde in der Zusammensetzung, die sich aus der Optimierung der Mineralsalzkonzentrationen ergab, eingesetzt. Maximale PL-Bildung (□) und Zelltrockengewichte (▨) wurden gegeneinander aufgetragen. Die Zugabe erfolgte im allgemeinen nach 48 h Kultur durch Sterilfiltration.

1 = +100 mg Leucin
2 = +500 mg Mevalonsäure
3 = +100 µl Methylbutenol
4 = +IPP/GPP/FPP/Mg^{2+}
5 = +300 µl Humulen
6 = Kontrolle
7 = Squalen als C-Quelle
8 = + 1 g Squalen

3.3.5 PL-Produktion von S.arenae TÜ 469 unter dem Einfluß von Chloroquin und Phenobarbital

Prozesse, die im Zusammenhang mit der Regulation von Primär- und Sekundärmetabolismus oder der Differenzierung stehen, bedürfen intrazellulärer Effektoren. Nachdem in Enterobacteriaceae gezeigt werden konnte, daß dort z.B. die Katabolitrepression durch einen Abfall des c-AMP-Gehalts vermittelt wird, wurde die Bedeutung des c-AMP-Gehalts für die Regulation des Sekundärmetabolismus und der Differenzierung in Streptomyceten kontrovers diskutiert (27). Ein charakteristischer Verlauf des c-AMP-Spiegels in Relation zur Produktion von Sekundärmetaboliten bei der Differenzierung und der Sporenkeimung konnte zwar schon mehrfach nachgewiesen werden (39,79), doch ist die Bedeutung dieses Phänomens noch umstritten. Colombo ét al. (21) beschrieben eine Steigerung des c-AMP-Spiegels in Wildstämmen von S.fradiae unter der Wirkung von Chloroquin, wodurch in den behandelten Zellen eine Steigerung der Tylosin-Produktion auftrat. Aus diesem Grund wurde die PL-Produktion von S.arenae TÜ 469 nach Zugabe von Chloroquin untersucht. Bei einer anschließenden Steigerung der Produktion hätte eine c-AMP-Kontrolle der Produktion postuliert werden können.
Supplementierung von 200 - 800 µg Chloroquin/ml blieben jedoch ohne Wirkung auf Wachstum und PL-Bildung beim untersuchten Stamm. Aus diesem Grund und unter Berücksichtigung des geringen Einflusses, den der Phosphatgehalt des Mediums auf die PL-Bildung ausübt (116), ergab sich keine Indikation für eine Kontrolle der PL-Produktion über c-AMP.

Phenobarbital kann in bestimmten Prokaryonten, wie z.B. Bacillus megaterium, die Synthese eines Fettsäuren-oxidierenden Cytochrom-P-450-Enzymkomplexes induzieren, obwohl es weder Substrat noch Aktivator dieses Komplexes ist. In B.megaterium besitzt dieses P-450-System ein Molekulargewicht von 150 000 und setzt sich aus 3 Proteinen zusammen: einem NADPH-oxidierenden Protein, einem Protein vom Ferredoxin-Typ und einem Cyt P-450-Protein. Dieser Komplex kann gesättigte Fettsäuren zu 2-Ketofettsäuren oxidieren und Epoxide aus einfach ungesättigten Fettsäuren bilden (66). Da in

S.arenae TÜ 469 bei der PL-Biosynthese ähnliche Reaktionsschritte ablaufen müssen, sollte untersucht werden, ob ein derartiges System durch Phenobarbital zu induzieren wäre. Unter der Voraussetzung, daß ein derartiges Enzymsystem limitierend an der PL-Synthese beteiligt ist, wäre nach Phenobarbital-Behandlung eine Steigerung zu erwarten gewesen.
8 mM Phenobarbital wurde einer Kultur nach 24 h in Minimalmedium steril zugegeben und die PL-Bildung während der darauffolgenden 195 h gemessen. Das Maximum der PL-Bildung lag 120 h nach Phenobarbitalzugabe bei 10% der Kontrolle, ebenso mußte eine Wachstumshemmung festgestellt werden. Diesem Ergebnis zufolge kann die Phenobarbitalinduktion eines Cytochrom-P-450-Systems, das entscheidend für die PL-Synthese wäre, vermutlich ausgeschlossen werden. Bei einer möglichen Induktion hätte die gleiche spezifische PL-Bildung wie in der Kontrollkultur auch dann stattfinden müssen, wenn das hypothetische P-450-System nicht der limitierende Schritt in der Biosynthese wäre.

3.3.6 Einfluß supplementierter Aminosäuren auf die PL-Produktion von S.arenae TÜ 469 in Minimalmedium und Resting cell Medium

3.3.6.1 Regulatorische Wirkung von Aminosäuren

In Vorversuchen wurde mehrmals versucht,im Rohextrakt verschiedener Streptomycetenstämme die Pyruvat Dehydrogenase über ihre Pyruvatdecarboxylase-Aktivität im optischen Test zu bestimmen. Hierbei wurde in allen untersuchten Fällen keine oder eine äußerst geringe Aktivität gefunden. Infolgedessen mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß Acetyl-CoA in Streptomyces arenae TÜ 469 nicht in der in Eukaryonten üblichen Menge gebildet wird. In diesem Fall könnte die Konzentration des aus Acetyl-CoA gebildeten HMG-CoA sich limitierend für die Biosynthese aller Produkte des Mevalonsäurewegs auswirken. Unter der Voraussetzung der Existenz des Stoffwechselwegs, der eine Bildung von HMG-CoA über den Biosyntheseweg der Aminosäuren Valin und Leucin ermög-

licht, schien die Aminosäure Leucin eine sinnvolle und günstige Vorstufe der Terpensynthese zu sein, da auf diesem Weg HMG-CoA in ausreichender Menge gebildet werden könnte. Außerdem konnten kaum Zweifel an einem Transport von Leucin in die Zelle bestehen. Voraussetzung für die Verstoffwechslung von Leucin in Richtung des Mevalonsäurewegs war außerdem die Reversibilität der Reaktion von Ketoisocapronsäure zu Leucin. Diese Reaktion wird entweder über eine Leucin Dehydrogenase oder eine Leucin-abhängige Transaminase katalysiert.

Zunächst sollte die PL-Bildung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Leucin-Supplementierung in Minimalmedium getestet werden. 100 mg Leucin wurden nach 48, 72 und 96 h Kultur zugegeben und die PL-Konzentration während der darauffolgenden Tage im Vergleich mit einer Kontrollkultur bestimmt. Wie aus Abb. 24 hervorgeht, fiel die gebildete PL-Menge in allen Kulturen, denen Leucin zugesetzt worden war, für 48 h auf ein sehr niedriges Niveau ab, um dann wieder auf eine maximale Produktion anzusteigen, die mit der der Kontrollkultur vergleichbar war. Dieses Verhalten wurde auch dann beobachtet, wenn Leucin zum Zeitpunkt maximaler PL-Produktion zugesetzt wurde. Für diese Beobachtung schienen zwei Erklärungen möglich:

Unter der Voraussetzung, daß HMG-CoA nur in geringer Menge aus Acetyl-CoA gebildet werden kann und daß die Reaktion Ketoisocaproat zu Leucin nicht reversibel verläuft, wäre es möglich, daß Leucin durch Hemmung seiner eigenen Biosyntheseenzyme die Bildung von Ketoisocaproat vermindert und nur wenig HMG-CoA gebildet werden kann, solange freies Leucin vorhanden ist.

Die zweite Möglichkeit bestünde darin, daß Leucin entweder durch eine Art Katabolitrepression ein entscheidendes Biosyntheseenzym von PL reprimiert oder durch direkte Hemmung eines Biosyntheseenzyms Einfluß auf die Syntheserate nimmt.

Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurde Ketoisocaproat als direkte Vorstufe von Leucin und vermutlich auch von HMG-CoA den Kulturen zugesetzt und die anschließende PL-Bildung verfolgt. Wie in Abb. 25 und 26 dargestellt ist, zeigte sich auch mit Ketoisocaproat eine 48 h anhaltende Hemmung der PL-Bildung, die unabhängig war von einer gleichzeitigen Supplementierung von Leucin.

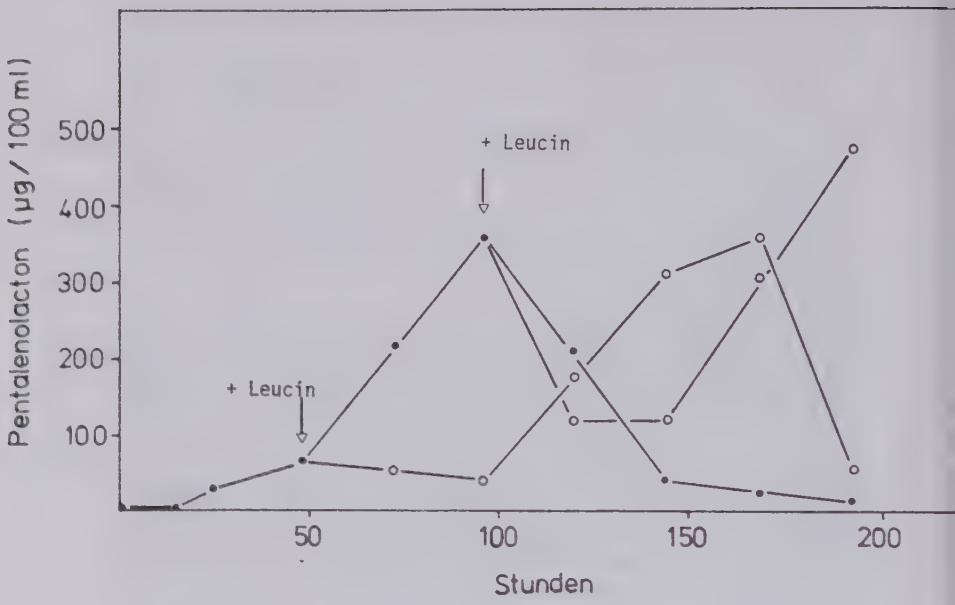


Abb. 24:
PL-Konzentration im Kulturfiltrat von S.arenae TO 469 nach Anzucht in Minimalmedium und Zugabe von 100 mg Leucin zur Kultur (○); Kontrollkultur (●).

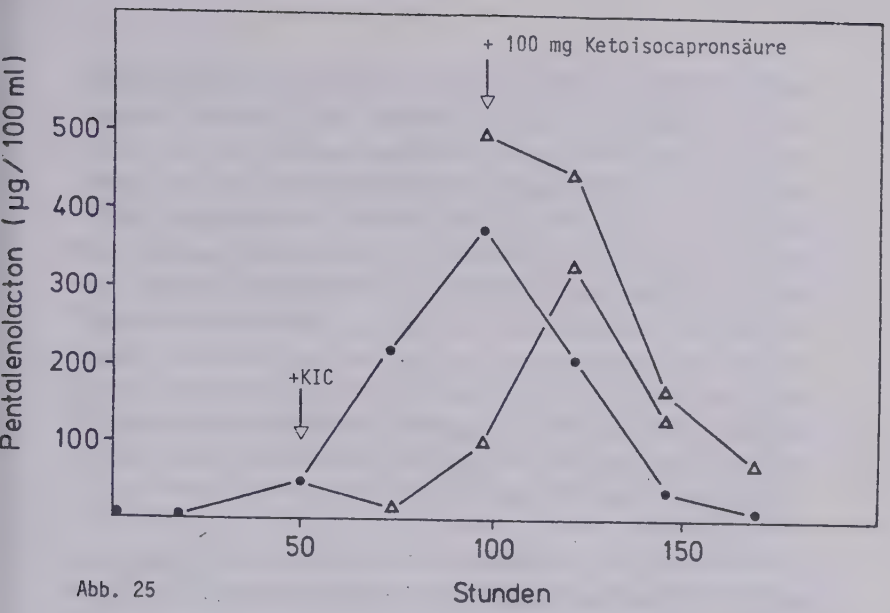


Abb. 25

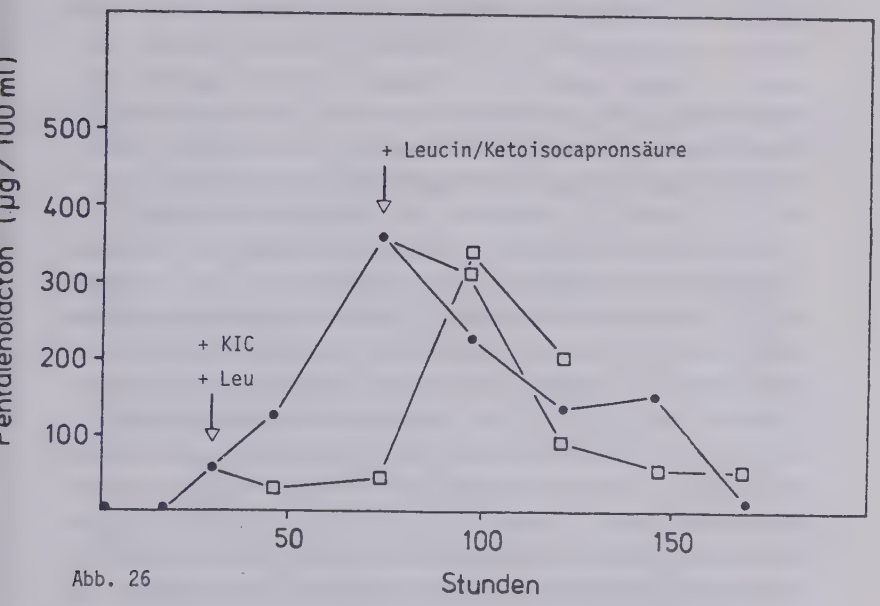


Abb. 26

Abb. 25 - 26:

PL-Konzentration im Kulturfiltrat von S.arenae TÜ 469 nach Anzucht in Minimalmedium und Zugabe von 100 mg Ketoisocapronsäure (△)(Abb.25) oder je 100 mg Leucin/Ketoisocapronsäure (□) (Abb. 26); Kontrollkultur (●).

Hieraus konnte geschlossen werden, daß Leucin seine Wirkung auf die PL-Bildung nicht über die Hemmung der Leucin-Biosynthese entfaltet. Es mußte folglich angenommen werden, daß Leucin entweder eine direkte Hemmung eines Biosynthesenzyms von PL bewirkt, oder als Repressor die Synthese eines derartigen Enzyms unterdrückt. Außerdem konnte durch Messung einer Leucin Dehydrogenase-Aktivität im Rohextrakt von S.arenae TÜ 469 gezeigt werden, daß die Reaktion von Ketoisocapronsäure zu Leucin gegenüber der Rückreaktion zwar bevorzugt war, die Reaktion aber im Prinzip reversibel verläuft. Eine Leucin-abhängige Transaminase konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Leucin Dehydrogenase von supplementiertem Leucin konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

Mit der Untersuchung der Produktion unter Resting cell Bedingungen sollte der Versuch gemacht werden, die Produktion vom Mycelwachstum zu entkoppeln, um auf diese Weise die Einflüsse von Vorstufen und regulatorisch wirkenden Verbindungen besser untersuchen zu können. Dabei sollte besonders die Proteinsynthese bei der Untersuchung des Einbaus von ^{14}C-Leucin in terpenoide Verbindungen vermindert werden. Als Nebenaspekt dieser Versuche ergab sich, daß unter Resting cell Bedingungen eine weit bessere Analytik der gebildeten Sekundärmetaboliten über HPLC möglich war.
Zunächst wurde die PL-Produktion von Zellen untersucht, die nach unterschiedlichen Zeiten der Kultur in Minimalmedium in das Resting-cell Medium überführt wurden. Dieses enthielt die gleichen Salze, Mannit und Asparagin wie das Minimalmedium, jedoch kein Phosphat und war mit MES (15 mM) oder PIPES (10 mM) auf pH 6.2 gepuffert. Es zeigte sich, daß Zellen, die zum Zeitpunkt maximaler PL-Produktion in das Resting cell Medium überführt wurden, innerhalb von 24 h nochmals maximale PL-Mengen synthetisieren konnten (350 - 450 µg/100 ml). Allerdings stagnierte die Synthese anschließend und der Abbau des Pentalenolactons erfolgte fast genauso schnell wie die vorangegangene Synthese. Nach 24 - 48 h in Resting cell Medium konnte die Bildung eines roten Pigments im Kulturfiltrat beobachtet werden. Gleichzeitig begannen die Mycelpellets zu fragmentieren. Wurden die Zellen nach 24 oder 96 h

Kultur in Produktionsmedium in das Resting cell Medium überführt, so war nur eine geringe PL-Produktion unter Resting cell Bedingungen festzustellen. Die Produktion war folglich zeitlich an eine definierte Wachstumsphase der Kultur gebunden. Die Produktion von PL während der ersten 24 h unter Resting cell Bedingungen hängt vermutlich mit dem geringen noch möglichen Wachstum oder der damit verbundenen Stoffwechsellage der Zellen während dieser Zeit zusammen.

Die Wirkung von Leucin auf die PL-Synthese wurde auch unter Resting cell Bedingungen getestet. 100 mg Leucin wurden Zellen zugegeben, die nach 48 h Kultur umgesetzt worden waren. Nach 24 h in Resting cell Medium hatten die Zellen 365 µg PL/100 ml Kultur produziert, genau die gleiche Menge, die die Kontrolle ohne Leucin produziert hatte. Leucin ist demnach nicht in der Lage, die PL-Bildung unter Resting cell Bedingungen zu unterdrücken. Damit konnte auch eine direkte Hemmwirkung von Leucin auf ein Enzym der PL-Biosynthese ausgeschlossen werden.

Die Beobachtung, daß 2-Ketoisocapronsäure die gleiche Wirkung wie Leucin zeigte, muß vermutlich mit der schnellen Umsetzung zu Leucin erklärt werden. Das gebildete Leucin wäre auch in diesem Fall die regulierende Substanz.
Um die Hypothese von der schnellen Metabolisierung von Ketoisocaproat zu Leucin zu überprüfen und um außerdem nachzuweisen, daß Leucin und Ketoisocaproat tatsächlich Vorstufen von PL darstellen können, wurden ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Ketoisocaproat zu Kulturen supplementiert, die nach 55 h in Minimalmedium auf Resting cell Bedingungen umgesetzt worden waren. Das Ergebnis nach 24 h Inkubation geht aus Tabelle 7 hervor. Bei Verfütterung von ^{14}C-Leucin fanden sich 0.9% der Radioaktivität in der Chloroform-extrahierbaren Terpenfraktion wieder, der Großteil wurde auch unter Resting cell Bedingungen in nicht Chloroform-extrahierbare Verbindungen eingebaut. Bei Zusatz von ^{14}C-Ketoisocaproat befanden sich 1.6% der eingesetzten Radioaktivität in der Fraktion mit den Produkten des Isoprenoidstoffwechsels; auch hier wurde also der Großteil in Protein eingebaut. Dies bestätigte die schnelle Um-

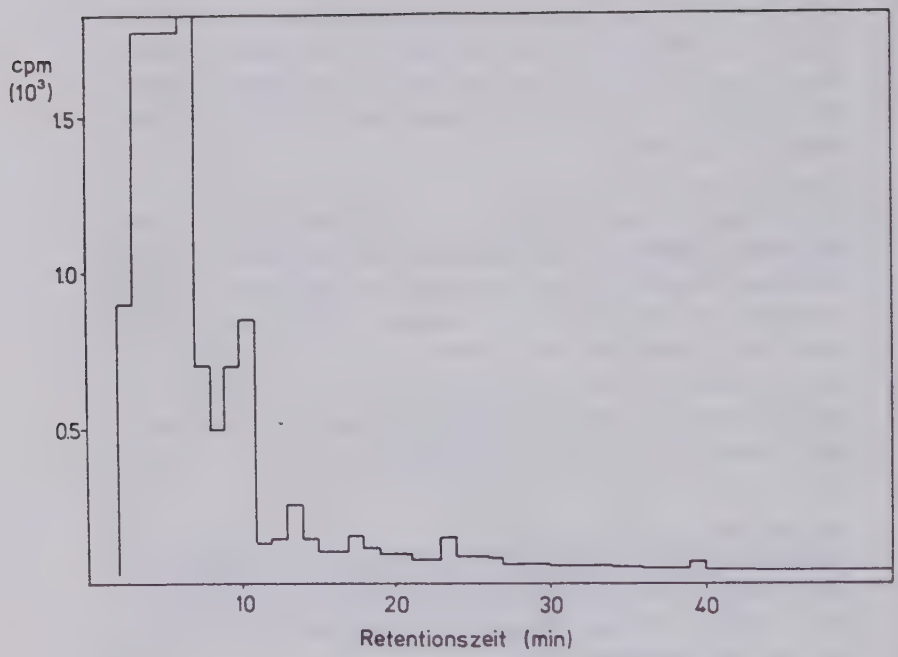


Abb. 27 :
Auftrennung der Terpenfraktion aus S.arenae TO 469 über HPLC nach Verfütterung von ^{14}C-Ketoisocapronsäure unter Resting cell Bedingungen.
5 µCi (20 mg) ^{14}C-Ketoisocapronsäure wurden Zellen von S.arenae TO 469 unter Resting cell Bedingungen und Zusatz von Puromycin zugesetzt. Nach 24 h wurde die Kultur abgebrochen und sowohl die Zellen wie das Kulturfiltrat mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroformphasen wurden eingeengt, in Methanol aufgenommen und 100 µl über analytische HPLC (10 µm, Lichrosorb RP 18, Methanol:H_2O 1:1, pH 2.7) aufgetrennt (siehe 2.4.4.1). Die Radioaktivität wurde in 1-min-Fraktionen (1ml) mit Triton-Toluol-Scintillator bestimmt. Die Retentionszeiten der bekannten PL-Verbindungen aus S.arenae sind unter 2.4.4.1 aufgeführt.

setzung von Ketoisocaproat zu Leucin und auch den prinzipiellen Vorstufencharakter von Leucin und Ketoisocapronsäure. Die Verfütterung von ^{14}C-Ketoisocaproat wurde nach Zugabe von Puromycin (0.2 mg/ml) wiederholt. Anschließend fanden sich 3% der Radioaktivität in der Terpenfraktion. Aliquots dieser Fraktion wurden über HPLC aufgetrennt und, soweit möglich, identifizierten PL-Verbindungen zugeordnet (siehe Abb. 27). Interessanterweise waren sehr viele der bevorzugt radioaktiv markierten Verbindungen mit keinem bisher bekannten Pentalenlacton in Verbindung zu bringen.

Die Struktur der Fraktion mit einer Retentionszeit von 6 - 9 min im angegebenen System stimmt möglicherweise mit der unter 3.7.6 untersuchten Substanz überein. Die bevorzugt markierte Fraktion mit der Retentionszeit von 4 - 6 min enthält nach bisherigen Ergebnissen Abbauprodukte von PL. Weiter fiel auf, daß im Bereich der Elution des PL-Chlorhydrins fast keine ^{14}C-Aktivität auftrat. Dies ist ein Hinweis darauf, daß das Chlorhydrin evtl. als Aufarbeitungsartefakt angesehen werden muß.

Nach den bisher beschriebenen Ergebnissen ergab sich die Frage, inwieweit die Hemmung der PL-Synthese spezifisch nur von Leucin ausgeübt werden kann. Nach Supplementierung verschiedener Aminosäuren zu Kulturen in Minimalmedium und anschließender PL-Bestimmung sollte ermittelt werden, in welchem Maß auch andere Aminosäuren Einfluß auf die PL-Produktion nehmen.
Es wurden 100 mg der proteinbildenden Aminosäuren 48 alten Kulturen zugesetzt. Bei Methionin und Cystein wurde eine anhaltende Hemmung der PL-Bildung beobachtet. Allerdings zeigte die Überprüfung des Trockengewichts als Maß für das Zellwachstum, daß Methionin und Cystein auch das Zellwachstum vollständig hemmten, während nach Leucinzugabe 80% des Wachstums der Kontrolle gefunden wurden. Daraus konnte geschlossen werden, daß Cystein und Methionin in Konzentrationen von 8.2 bzw. 6.7 mM toxisch auf S.arenae TÜ 469 wirkten. Glycin zeigte einen vergleichbaren, wenn auch etwas schwächeren Effekt auf die PL-Bildung, ohne eine Hemmung des Wachstums zu bewirken (siehe Tab. 8).

Alle anderen untersuchten Aminosäuren blieben ohne deutliche Auswirkung auf die gebildete PL-Menge, so daß der Wirkung von Leucin und Glycin eine relative Spezifität zukommt.

Tabelle 7: Bilanzierung des ^{14}C - Einbaus in Zellen und verschiedene Fraktionen des Kulturfiltrats von S.arenae nach Verfütterung von ^{14}C-Leucin und ^{14}C-Ketoisocapronsäure unter Resting cell Bedingungen

Fraktion	+^{14}C-Leucin	+^{14}C-KIC	+^{14}C-KIC + Puromycin
CO_2	8 000	38 000	11 500
Mycel* n. Extraktion	8.7×10^6	8.0×10^6	7×10^6
Kulturfiltrat n. Extraktion	1.4×10^6	2.0×10^6	2.7×10^6
$CHCl_3$-Phase**	1×10^5	1.8×10^5	3×10^5

Es wurden in allen Fällen 20 mg (5 µCi ≙ 11.1×10^6 cpm) Leucin oder Ketoisocapronsäure eingesetzt. Die Zugabe erfolgte zu Kulturen unter Resting cell Bedingungen.

*Die Zählrate wurde nach Auszählung von Aliquots mit 5 ml Triton-Toluol-Szintillator in cpm angegeben, wobei bei den Mycelproben die Zählrate wegen des Farbquenchs über eine Korrekturkurve ermittelt wurde.

Die Synthese des eingesetzten ^{14}C-Ketoisocaproats erfolgte wie unter 2.4.6.6 beschrieben.

**Die Chloroformphase setzte sich aus den vereinigten organischen Phasen nach getrennter Extraktion von Zellen und Kulturfiltrat zusammen.

Puromycin wurde in einer Menge von 20 mg/100 ml zugesetzt.

Tabelle 8:
PL-Produktion und Myceltrockengewicht (BTM) von S. arenae TO 469 in Minimalmedienkultur nach Supplementierung von Aminosäuren

100 ml Schüttelkulturen wurden zum Zeitpunkt 48 h mit jeweils 100 mg Aminosäure (0.1%) versetzt. Das Minimalmedium wurde in der Zusammensetzung verwendet, die sich aus der Optimierung der $CaCl_2$- und der $FeSO_4$-Konzentration ergab.

Zeit	(h)	48	72	96	120
Kontrolle	PL (µg/100 ml)	100	155	270	450
	BTM(mg/100 ml)	230	350	480	640
+Leu	PL	45	53	38	177
	BTM	230	320	440	535
+Gly	PL	190	120	155	450
	BTM	250	410	670	690
+Cys	PL	53	24	45	50
	BTM	270	270	240	350
+Met	PL	45	56	101	63
	BTM	280	270	250	300

3.3.6.2 Einfluß der Asparagin-Konzentration auf die PL-Bildung

Bei der Bestimmung des ATP-Gehalts des Mycels aus Schüttelkulturen (siehe 3.4.2.) zeigte sich, daß sich der spezifische ATP-Gehalt zum Zeitpunkt maximaler PL-Bildung stark verändert. Da die Bedeutung des Mannitgehalts im Medium bereits untersucht war, lag der Gedanke nahe, daß eine Verarmung der Kultur an der N-Quelle Asparagin und die Umstellung des Stoffwechsels auf die zweite Stickstoffquelle Ammoniumsulfat an diesem Verlauf des ATP beteiligt sein könnte. Nach Erhöhung der Asparaginkonzentration im Medium wäre demnach eine längere Wachstumsphase und evtl. eine höhere PL-Produktion zu erwarten gewesen.
Aus diesem Grund wurde die Konzentration von Asparagin zwischen 1 und 10 g/l variiert und die PL-Bildung unter den neuen Bedingungen getestet. Außerdem wurde der ATP-Gehalt und das Zellwachstum gemessen. Zwar wurde keine längere Wachstumphase beobachtet, dafür erfolgte stärkeres Wachstum, und es konnte eine Steigerung der PL-Produktion mit steigender Asparaginmenge gemessen werden. Auf das Verhalten des spezifischen ATP-Gehalts unter diesen Bedingungen wird unter 3.4.2 eingegangen. Aus Abb. 28 wird ersichtlich, daß die PL-Bildung mit 7.5 g/l Asparagin (ca. 50 mM) um den Faktor 4 über den bis dahin gefundenen Werten lag. Abgesehen von der Steigerung der PL-Produktion konnte noch das Auftreten eines roten Pigments im Kulturfiltrat und verstärkte Fragmentierung der Mycelpellets nach 96 bis 120 h beobachtet werden. Insgesamt waren die beobachteten Pelletdurchmesser geringer als in den Kulturen mit geringerem Asparagingehalt.

Aus diesem Versuchs resultierte ein Minimalmedium mit einem optimalen Gehalt an Asparagin von 50 mM. Aus Abb. 29 geht das Ausmaß der Produktionssteigerung durch Optimierung der Asparaginkonzentration im Verhältnis zu den anderen beschriebenen Optimierungen hervor.

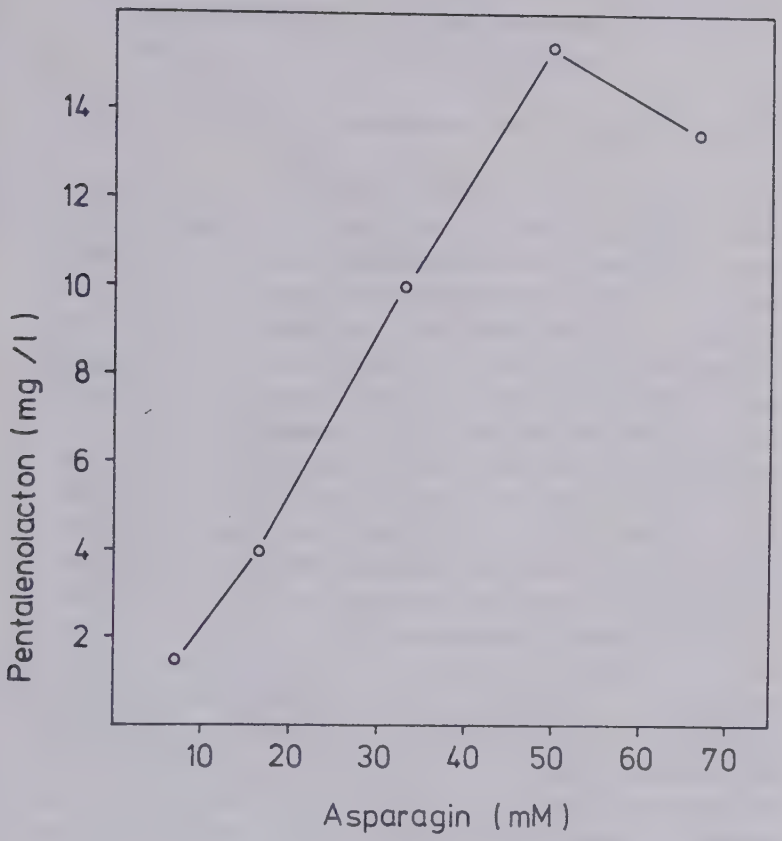


Abb. 28 :
Abhängigkeit der PL-Produktion von der Asparaginkonzentration in Minimalmedium
Die maximale PL-Bildung von S.arenae TÜ 469 wurde in Abhängigkeit von der Asparaginkonzentration des Mediums aufgetragen.

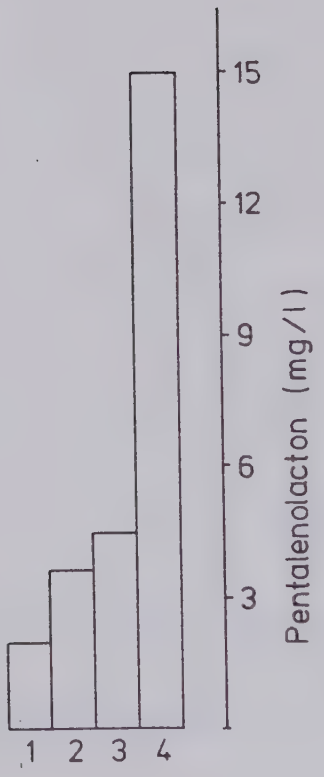


Abb. 29 :

Darstellung der maximalen PL-Ausbeuten nach Optimierung einzelner Komponenten des Minimalmediums

1 = Minimalmedium nach Zdunek (115)

2 = Produktion nach Optimierung der $CaCl_2$-Konzentration

3 = Produktion nach Optimierung der Eisensulfatkonzentration

4 = Produktion nach Optimierung der Asparaginkonzentration

3.4 Zeitlicher Verlauf der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase Aktivität und des spezifischen ATP-Gehalts während der Kultur von S.arenae TÜ 469 in Minimalmedium

3.4.1 Verlauf der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase Aktivität

Angesichts der Beziehungen zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ist es nicht verwunderlich, daß die jeweils daran beteiligten regulatorischen Mechanismen einander ziemlich gleichen (28). Die wichtigsten Regulationsmechanismen können unter den Begriffen Substratinduktion, Endproduktrepression und - hemmung, Katabolitrepression und -hemmung sowie in der Regulation über den ATP-Gehalt oder "energy charge" (5) zusammengefaßt werden. Außerdem sind in Streptomyceten noch niedermolekulare Sekundärmetaboliten nachgewiesen worden, die als Differenzierungsfaktoren sowohl die Produktion von Antibiotika als auch die Bildung von Luftmycel und Sporen beeinflussen (50). Im Zusammenhang mit der Vermittlung derartiger Regelmechanismen konnte bereits mehrfach der Aktivität von Schlüsselenzymen eine wichtige Rolle zugeordnet werden. Zu diesen Schlüsselenzymen gehört in manchen Streptomyceten die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, das Enzym, das die intrazelluläre Glucose-6-phosphat Konzentration entscheidend beeinflußt. Das Enzym scheint in Überproduzenten von Sekundärmetaboliten häufig gehemmt zu werden. Hierbei findet eine Anhäufung des Substrats Glucose-6-phosphat statt. Glucose-6-phosphat wird ebenso wie c-AMP, c-GMP und Adenosinpolyphosphate als Effektor der intrazellulären Regulation diskutiert (27). Nach Hostalek et al. (46) scheint die G6PDH in chlortetrazyklinproduzierenden S.aureofaciens über den Phosphatgehalt des Mediums reguliert zu werden. Im Streptomycinproduzenten S.griseus unterliegt nach Khokhlov die G6PDH einer Hemmung durch Adenosindiphosphoribosephosphat (ADPR-P), das durch die Wirkung eines Differenzierungsfaktor aus NADP gebildet wird (51).

Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde im Verlauf einer Kultur von S.arenae TÜ 469 bestimmt. Überraschenderweise zeigte das Enzym eine fast konstante, relativ hohe Aktivität verglichen mit den Ergebnissen von S.aureofaciens (46), wie aus Abb. 30

ersichtlich wird. Außerdem konnte keine Hemmung durch Phosphat bis 100 mM festgestellt werden. Die Enzymaktivität war nicht ausgesprochen coenzymspezifisch. Das Verhältnis der Aktivität mit NADP zur Aktivität mit NAD betrug konstant 1.5. Es gab keine Anhaltspunkte für einen Einfluß der G6PDH-Aktivität bei der Regulation der PL-Synthese in S.arenae.

3.4.2 Verlauf des spezifischen ATP-Gehalts

Als wichtiger Parameter für die Stoffwechsellage einer Kultur kann der spezifische Gehalt an ATP angesehen werden. Nach Atkinson (5) wäre die Bestimmung des "energy charge" noch aussagekräftiger. Bei Bestimmung des ATP-Gehalts der Zellen von S.arenae in Minimalmedium wurde beobachtet, daß nach einem zunächst fast logarithmischen Verlauf, der deutlich steiler als die Zunahme der Zelltrockenmasse war, ein plötzlicher Abfall nach 90 bis 96 h Kulturzeit stattfand. Wurde der ATP-Gehalt auf das Zelltrockengewicht bezogen, verlor dieser Verlauf nichts an Deutlichkeit, wie aus Abb. 31 hervorgeht. Dieser Abfall des spezifischen ATP-Gehalts fällt mit dem Zeitpunkt maximaler PL-Produktion zusammen. Hieraus waren zunächst zwei Schlüsse möglich: Entweder ein für die Bildung von ATP, und damit indirekt auch für die Bildung von PL, notwendiges Substrat war im Medium verarmt, oder das gebildete PL seinerseits hemmte durch Inaktivierung der GAPDH die Kohlenhydratverwertung und damit den Energiestoffwechsel von S.arenae TÜ 469.
Aufgrund der ersten Hypothese wurde Asparagin, als weiterer Bestandteil des Minimalmediums, in seiner Konzentration variiert, und PL-Bildung und ATP-Gehalt in Abhängigkeit von der Asparaginkonzentration untersucht. Das Ergebnis war überraschend; denn mit steigender Asparaginmenge wurde mehr PL gebildet (siehe 3.1.6.2). Gleichzeitig mit der Steigerung der gebildeten PL-Menge war aber auch der Abfall des spezifischen ATP-Gehalts umso größer. Diese Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt.
Damit war eine Substratverarmung unwahrscheinlich geworden. Eine mögliche Wechselwirkung von PL-Konzentration und ATP-Bildung

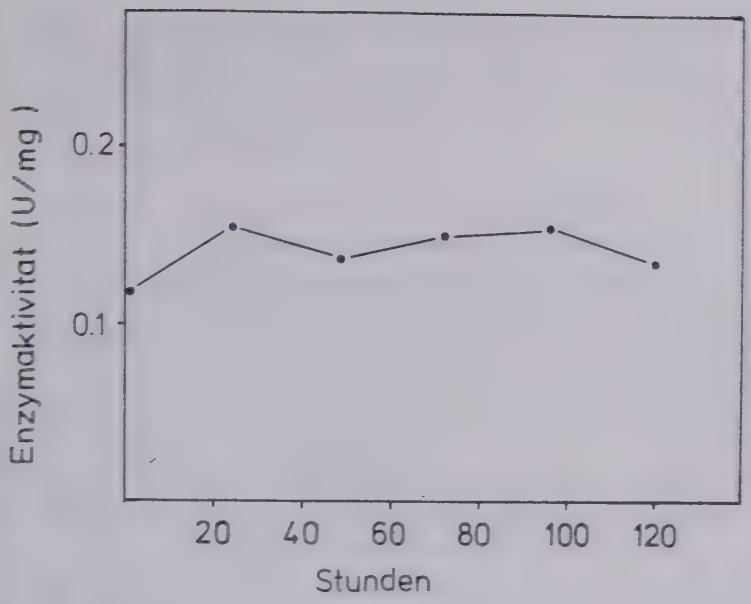


Abb. 30 :
Verlauf der spezifischen Aktivität der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase in S.arenae TC 469 in Minimalmedium (nach Optimierung der Calciumchlorid- und der Eisensulfatkonzentration).

Tabelle 9:
Abhängigkeit des spezifischen ATP-Gehalts, des Trockengewichts der Zellen und der PL-Bildung,nach 96 h Kulturzeit,vom Gehalt des Minimalmediums an Asparagin

Asparagingehalt (g/l)	BTM (mg/100 ml)	ATP (ng/mg BTM)	PL (µg/100 ml)
1.0	320	103	150
2.5	640	22	450
5.0	650	4.5	950
7.5	800	3.0	1550
10.0	870	1.8	1375

scheint möglich. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß die PL-Bildung in Zusammenhang mit dem Stickstoffmetabolismus reguliert wird, und die Wirkung von Asparagin in diesem Bereich zu suchen ist.

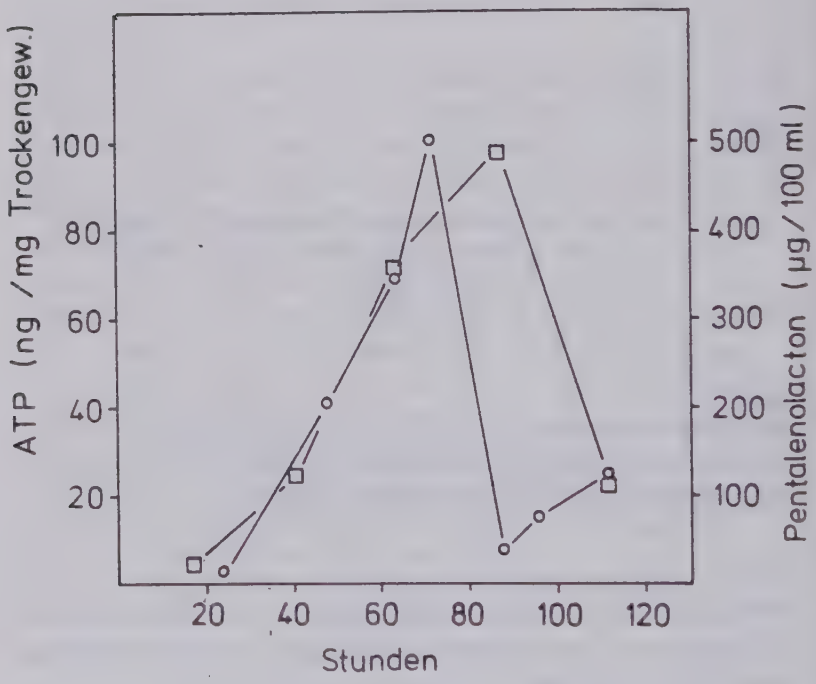


Abb. 31 :
Verlauf des spezifischen ATP-Gehalts und der PL-Produktion von S. arenae TO 469 während einer Kultur in Minimalmedium (27.5 mM $CaCl_2$, 0.36 mM $FeSO_4$, 17 mM Asparagin).
(○) ATP, (□) PL

3.5 Messung der Aktivität von Enzymen der Pentalenolactonbiosynthese

3.5.1 Messung der HMG-CoA Reduktase Aktivität

Der Test zur HMG-CoA Reduktase Aktivitätsbestimmung wurde entsprechend dem Verfahren zur Bestimmung der HMG-CoA Reduktase in der Mikrosomenfraktion aus Rattenlebern entwickelt (47). Entgegen der beschriebenen Methode erfolgte die Abtrennung des Produkts in Form der Mevalonsäure und nicht als Lacton. In den Vorversuchen wurde die Zeit- und Proteinabhängigkeit, sowie die Substratsättigung und die Substratspezifität ausgetestet. Bei der Untersuchung von Rohextrakten fielt auf, daß die spezifische Enzymaktivität sehr viel geringer war als in Rattenlebermikrosomen. Die Aktivität war offensichtlich löslich und nicht membranständig. Wie aus Tab. 10 hervorgeht, blieb sowohl bei Verwendung von Detergentien als auch nach 100 000 x g Zentrifugation die spezifische Aktivität weitgehend konstant. In dieser Hinsicht entsprach die Enzymaktivität der einzigen bisher bestimmten HMG-CoA Reduktase aus Bakterien (82). Es zeigte sich, daß die Aktivität in S.arenae TÜ 469 keine ausgesprochene Coenzym-Spezifität aufwies. Sowohl NADH als auch NADPH konnten als Substrat verwendet werden, wobei sich mit NADPH geringfügig höhere Aktivitäten ergaben.
Wurde die Aktivität der HMG-CoA Reduktase im Verlauf einer Kultur von S.arenae in Minimalmedium getestet, so fand sich zu Beginn der Kultur eine erhöhte Aktivität, die nach 24 h schnell abnahm und nach 96 h im Bereich der Meßgenauigkeit des Enzymtests lag (siehe Abb. 32). Hieraus mußte geschlossen werden, daß gerade bei beginnender Produktion von PL die Bildung von Mevalonsäure stetig abnahm und zum Zeitpunkt maximaler PL-Bildung vollkommen stagnierte. Dies deutete darauf hin, daß der Mevalonsäureweg in der frühen Kultur sehr viel aktiver ist als in den späteren Kulturstadien. Angesichts der primären Funktion des Stoffwechselwegs, Vorstufen zur Synthese von Menachinon und Undecaprenypyrophosphat zu bilden, erscheint dieser Verlauf durchaus sinnvoll. Ein Problem für die Synthese von Sesquiterpenen scheint hierbei nur in der Limitierung der Produktion von Mevalonsäure nach 96 h zu

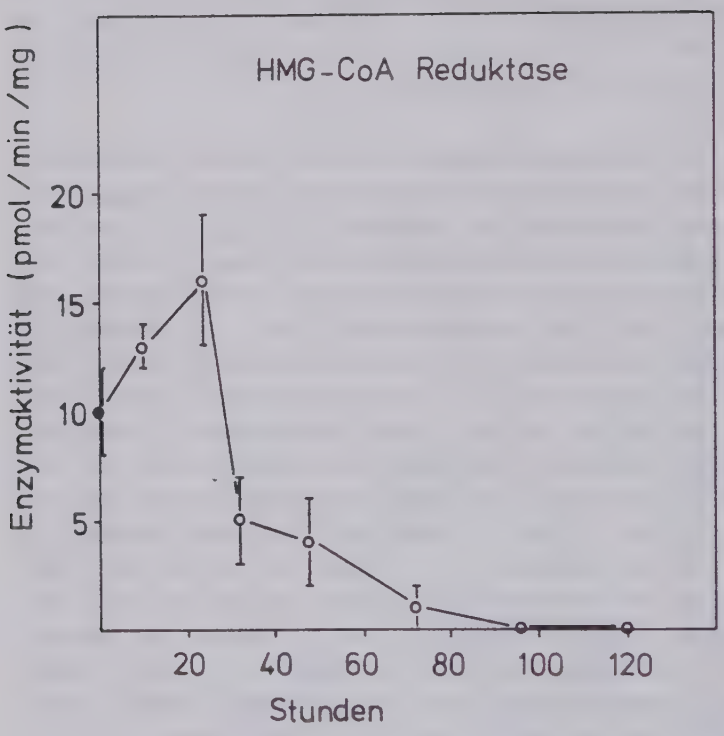


Abb. 32 :
Spezifische Aktivität der HMG-CoA Reduktase in S.arenae TÜ 469 im Verlauf einer Kultur in Minimalmedium
Die Aktivität wurde in 4 verschiedenen 100 ml Kulturen bestimmt und die gemessenen maximalen und minimalen Werte, sowie der Mittelwert der 4 Bestimmungen eingezeichnet.

bestehen. Es muß außerdem diskutiert werden, inwieweit die Umsetzung von HMG-CoA zur Mevalonsäure substrat- oder enzymlimitiert ist.
Ein vereinfachter HMG-CoA Reduktase-Test, bei dem die Trennung des Mevalonolactons über Ionenaustauscher stattfindet (33), konnte wegen der erhöhten Untergrundradioaktivität nicht verwendet werden.
Eine HMG-CoA Lyase-Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Die Analyse HMG-CoA spaltender Enzyme erfolgte nach Young und Berger durch Auftrennung der Spaltprodukte auf DC (114).

Tabelle 10:
Lokalisierung der HMG-CoA Reduktase in S.arenae TO 469

Zellen aus Wickerham Medium wurden gewaschen, geteilt und mit Glasperlen (ø 0.5 mm) 1 min lang aufgeschlossen und 5 min bei 5000 x g zentrifugiert. Die Hälfte des Ansatzes wurde unter Zusatz von 1% Triton X-100 aufgeschlossen. Jeweils ein Teil der Oberstände der Zentrifugation wurde anschließend 45 min mit 100 000 x g zentrifugiert. Verwendeter Puffer: 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5; 100 mM KCl, 25% Glycerin, 5 mM Mercaptoessigsäure, 5 mM EDTA.
Der Test auf die HMG-CoA Reduktase Aktivität der verschiedenen Oberstände wurde 20 min bei 30°C inkubiert und wie in 2.4.2.4 beschrieben durchgeführt.

Oberstand	Aktivitität pMol/min x mg
3000 x g	12.9 ; 13.2
3000 x g (1% Triton)	13.4 ; 12.6
100 000 x g	14.7 ; 16.4
100 000 x g (1% Triton)	15.5 ; 11.7

3.5.2 Messung der Aktivität der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase, der Dimethylallyltransferase, der Geranyltransferase und der Terpenoid-Allyltransferase

Die Messung der Enzymaktivitäten konnte in modifizierter Form nach Testverfahren erfolgen, die bei Bakterien bereits durchgeführt und beschrieben worden waren (85, 103). In Vorversuchen zeigte sich, daß die Enzymaktivitäten durch Jodacetat vollständig hemmbar waren. Deshalb wurde auf eine Beteiligung von SH-Gruppen an der Enzymkatalyse geschlossen. Dies entspricht den Verhältnissen in Eukaryonten und Bacillus subtilis, dagegen sind die Transferasen in Micrococcus lysodeicticus nicht mit Jodacetat hemmbar (44,85). Zusatz von Natriumfluorid zu den Testgemischen bewirkte keine Veränderung der Enzymaktivitäten, evtl. vorhandene Phosphatasen waren also entweder nicht hemmbar oder nur schwach aktiv. Die Phosphatase-Aktivitäten wurden durch Hexanextraktion von nicht angesäuerten Testansätzen bestimmt, wobei infolge der fehlenden Hydrolyse die Diphosphatverbindungen in der wässrigen Phase bleiben. Die Phosphatase-Aktivitäten waren wie vermutet sehr gering. Weitere Kontrollbestimmungen mit gekochten Rohextrakten wurden ebenfalls berücksichtigt. Die lineare Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der zugesetzten Proteinmenge konnte bis 0.5 mg/ml Protein nachgewiesen werden. Die Variation der Inkubationszeit ergab lineare Werte bis 60 min, und das Temperaturoptimum lag bei 30°C. Die optimalen pH-Bereiche stimmten mit den in der Literatur beschriebenen Werten anderer Organismen überein. Die Aktivität der IPP-Isomerase wurde bei pH 6.5 bestimmt, die Transferase-Aktivitäten bei pH 8.5. Die Aktivität der IPP-Isomerase bei pH 8.5 wurde ebenfalls bestimmt und von den Ergebnissen der Transferase-Aktivitäten subtrahiert, da die Isomerase-Aktivität in deren Ergebnis eingeht. Bei der Berechnung der Isomerase-Aktivität geht man bei Anwesenheit von Transferase-Aktivitäten von der Umsetzung von einem Molekül gebildetem DMAPP mit zwei Molekülen IPP aus. Deshalb wurden die Meßergebnisse für die IPP-Iomerase-Aktivität gedrittelt. Trotz dieser Korrektur zeigte die IPP-Isomerase die höchste Aktivität unter den untersuchten Enzymen des Mevalonsäurewegs.

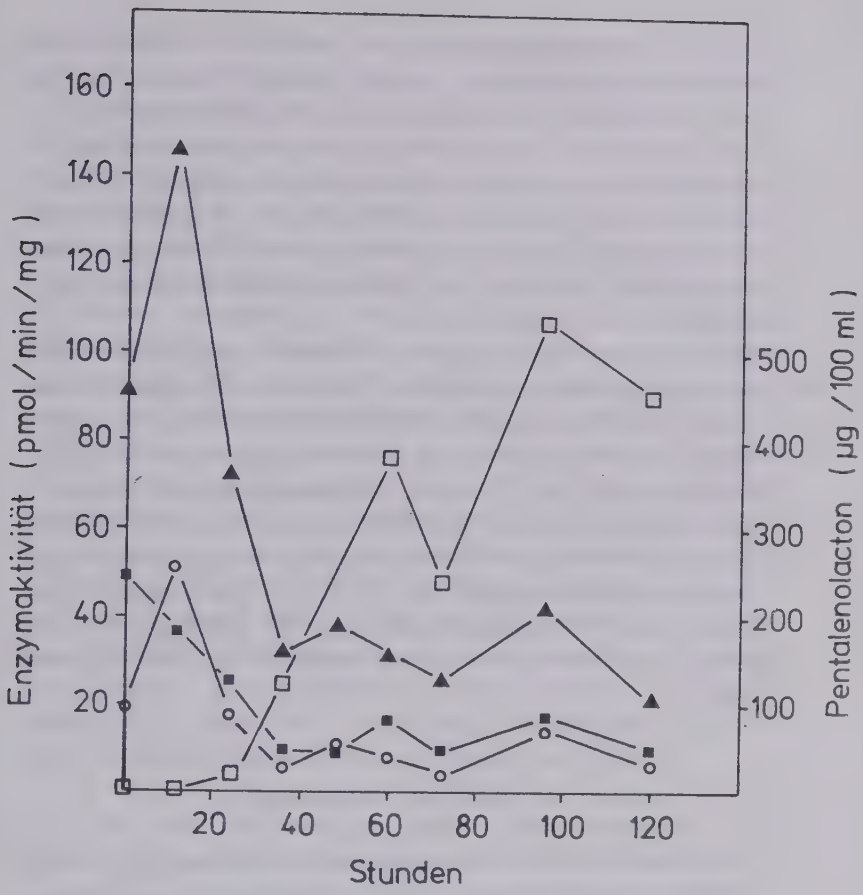


Abb. 33 :
Spezifische Aktivität von Enzymen der Isoprenoidsynthese im Verlauf einer Kultur von S.arenae TÜ 469 in Minimalmedium, sowie der Verlauf des gebildeten Pentalenolactons im Kulturfiltrat der untersuchten Kultur.
(▲) Isopentenylpyrophosphat Isomerase
(○) Dimethylallyl Transferase
(■) Geranyl Transferase
(□) Pentalenolacton

Bei der graphischen Darstellung der gemessenen Enzymaktivitäten während des Kulturverlaufs in Abb. 33 zeigte sich auch bei den hier untersuchten Enzymen ein Bereich maximaler Aktivität in komplexem Medium, aus dem überimpft worden war, sowie während der ersten 36 h in definiertem Medium. Anschließend sanken die Aktivitäten auf ca. 30% der Anfangsaktivität ab, blieben aber deutlich meßbar. Sie lagen insgesamt höher als die Aktivität der HMG-CoA Reduktase. Auch dies legt den Gedanken an eine enzymlimitierte Reduktion des HMG-CoA nahe.
Der fast identische Verlauf von Dimethylallyltransferase und Geranyltransferase ließ vermuten, daß beide Aktivitäten in einem Protein vereinigt sein könnten. In diesem Fall würde die Aktivität als Farnesylpyrophosphat-Synthetase bezeichnet (103).
Eine Aktivität, die ^{14}C-IPP auf Farnesylpyrophosphat überträgt, wurde ebenfalls gemessen; sie besaß geringere Aktivität mit einem anderen Verlauf der spezifischen Aktivität. Da es sich bei dieser Terpenoid-Allyltransferase (E.C. 2.5.1.11) um keine Aktivität handelt, die in einem Zusammenhang mit der Biosynthese von PL steht, fanden keine weiteren Untersuchungen in dieser Richtung statt.

3.5.3 Aktivität der Farnesylpyrophosphat-Zyklase

Der Test auf die FPP-Zyklase Aktivität im Rohextrakt von S.arenae TÜ 469 erfolgte im wesentlichen nach Cane und Tillman (17,18). Nach Vorversuchen wurden am beschriebenen Test einige Veränderungen vorgenommen.
Da 100 mM Phosphat die Prenyltransferasen in Eukaryonten zu 80 - 90% hemmt (44), und da die FPP-Zyklase ebenfalls ein Diphosphat umsetzt, wobei im Übergangszustand außerdem ein Pyrophosphat-Ionenpaar postuliert wird (15,17), schien es sinnvoll zu sein, einen phosphatfreien Puffer zu verwenden. Die Aktivität von Phosphatasen, die Cane als störenden Faktor beschreibt, konnten im Rohextrakt von S.arenae nicht gefunden werden. Außer dem Produkt Pentalenen wurde aus dem Testansatz mit Hexan nur eine weitere Verbindung extrahiert, die ausgehend von dem Substrat ^{14}C-tt-FPP

synthetisiert worden war. Da es sich hierbei weder um Farnesol noch um ein Terpenderivat handelte, wurde vermutet, daß es sich um Geranyl-geranyl- oder C_{30}-Pyrophosphat handelt. Diese Hypothese wurde bisher noch nicht überprüft.
Die Aktivität der FPP-Zyklase wurde auf Proteinabhängigkeit und Substratsättigung unter Versuchsbedingungen überprüft. Der Verlauf der spezifischen Aktivität des Enzyms in Rohextrakten von S.arenae TÜ 469 während einer Kultur unter Produktionsbedingungen ist in Abb. 34 dargestellt. Aus dem Verlauf wird ersichtlich, daß die FPP-Zyklase das erste Enzym darstellt, dessen Verlauf der spezifischen Aktivität offensichtliche Zusammenhänge mit der Bildung von Pentalenolacton erkennen läßt. Die FPP-Zyklase katalysiert auch die erste Reaktion in der PL-Biosynthesereihe, die nicht gleichzeitig Vorstufen für andere, für das Wachstum notwendige Substanzen liefert. Das Maximum der spezifischen Aktivität lag zwischen 36 und 48 h. Anschließend wurde bis 100 h eine relativ konstante Aktivität von 1 pMol/min/mg gemessen, die später schnell abnahm. Die Aktivität blieb in allen Fällen unter der spezifischen Aktivität der davor bestimmten Enzyme, wenn man von der geringen HMG-CoA Reduktase Aktivität nach 100 h absieht. Hierbei ist zu beachten, daß die HMG-CoA Reduktase nicht mit einer vergleichbaren Genauigkeit gemessen werden konnte.

Vergleicht man den Verlauf der spezifischen Aktivität der FPP-Zyklase mit dem Verlauf der mycelspezifischen Produktionsrate q in Abb. 26, so wird die auffallende Übereinstimmung beider Kurvenverläufe ersichtlich. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Aktivität der FPP-Zyklase entscheidend für die Bildung von Pentalenolacton ist. Bei Umrechnung der Enzymaktivität auf den Proteingehalt einer 100 ml Kultur liegt die Enzymaktivität in der gleichen Größenordnung wie die Produktion von PL.

Der Test wurde nach Abschluß der Messungen zu 3.2.4.3 und 3.2.5 vereinfacht, um auf die aufwendige Synthese von ^{14}C-tt-FPP und von Pentalenen als nicht markierter Trägersubstanz verzichten zu können. Für ^{14}C-FPP wurde ^{14}C-IPP eingesetzt, das durch die im Überschuß vorhandenen FPP-Synthetase-Aktivtäten in ^{14}C-FPP umge-

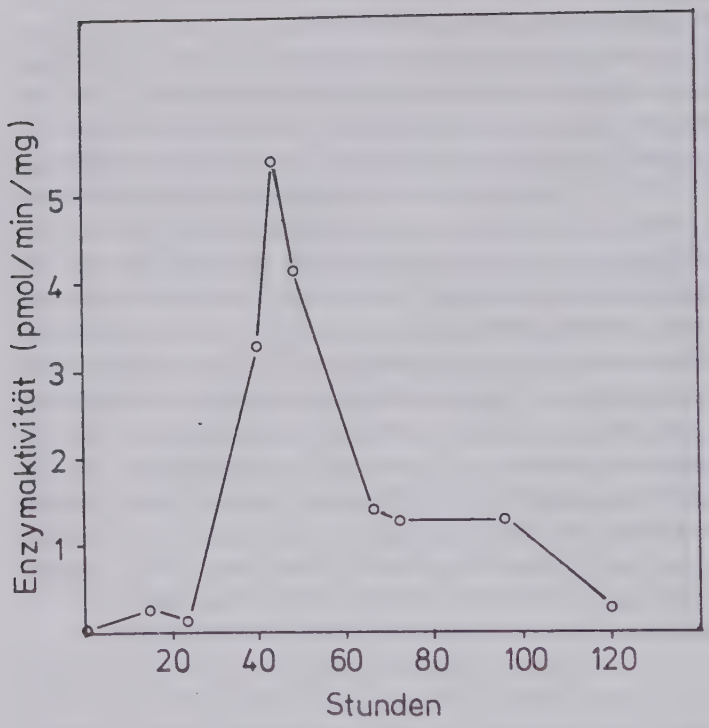


Abb. 34 :
Verlauf der spezifischen Aktivität der Farnesylpyrophosphat Zyklase in einer Kultur von S.arenae TÜ 469 in Minimalmedium
Die Werte wurden mit Zellen aus 2 - 6 100ml-Schüttelkulturen ermittelt.

wandelt wurde. Pentalenen konnte als Trägersubstanz durch Humulen ersetzt werden, solange keine Trennung der Reaktionsprodukte über Silbernitrat-Kieselgel erfolgte, da erst bei diesem Trennungsschritt Pentalenen und Humulen unterschiedliches Verhalten zeigten.

Die Produkte eines derartigen vereinfachten Ansatzes wurden nach Pentalenenzusatz auf $AgNO_3$-imprägnierten DC-Platten mit n-Hexan aufgetrennt und ausgezählt. Wie aus Abb. 35 hervorgeht, war Pentalenen das einzige Reaktionsprodukt der Terpenreihe, das aus ^{14}C-IPP gebildet wurde. Bei Zutritt von Sauerstoff muß natürlich mit einer größeren Anzahl von Reaktionsprodukten gerechnet werden, da Pentalenen weiter umgesetzt wird. Ansonsten kann jedoch aufgrund dieses Versuchs davon ausgegangen werden, daß keine anderen Terpenderivate in S.arenae TÜ 469 vorkommen. Daraus folgt, daß die FPP-Zyklase als hypothetisches Schlüsselenzym der PL-Synthese nicht nur eine sehr große Spezifität in Bezug auf Substrat und Produkt besaß, sondern auch die einzige Terpen- oder Sesquiterpensynthetisierende Aktivität in S.arenae TÜ 469 darstellt.

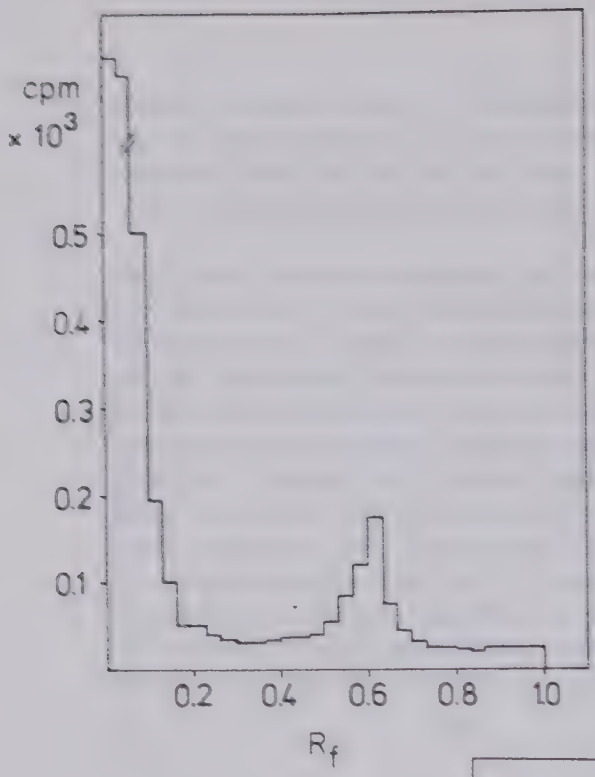


Abb. 35 a:
Auftrennung der Reaktionsp
des FPP-Zyklase-Tests über
mit Hexan:Äthylacetat 9:1
nach Verwendung von ^{14}C-IP
als Substrat

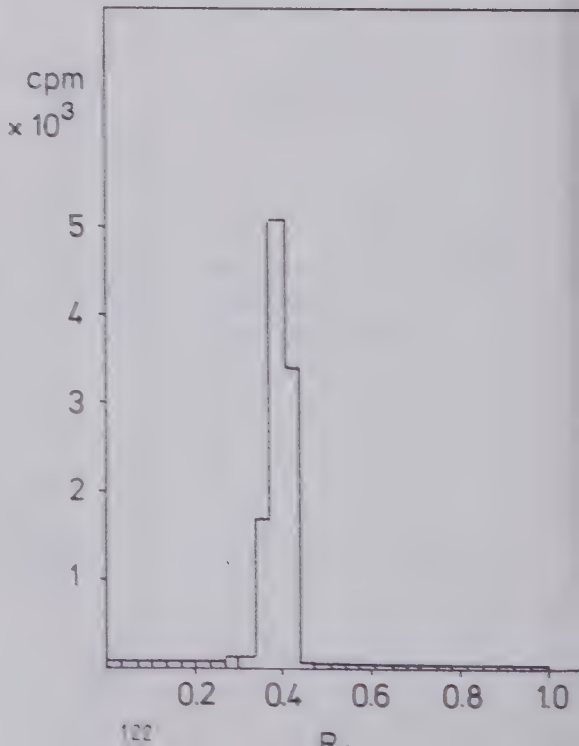


Abb. 35 b:
Auftrennung der Pentalenenbande der DC aus Abb. 35a über $AgNO_3$-imprägniertes Kieselgel durch Entwicklung mit n-Hexan
Im Test mit Rohextrakt aus einer 40 h Kultur in Minimalmedium wurde ^{14}C-IPP als Substrat eingesetzt.

3.6 Einfluß von Metaboliten auf die Aktivität der PL-Biosyntheseenzyme in vitro

3.6.1 Untersuchungen der HMG-CoA Reduktase

Die HMG-CoA Reduktase in der Leber von Säugetieren wird in einem ganz besonderen Ausmaß kontrolliert (30). Eine derartige Regulation erfolgt z.B. durch Cholesterin, das sowohl eine direkte Aktivitätshemmung als auch indirekte Repression bewirkt.
Eine entsprechende Hemmung der HMG-CoA Reduktase in S.arenae durch Substanzen, die die PL-Synthese hemmen, wie z.B. Humulen und Squalen, konnte nicht ausgeschlossen werden. Deshalb sollte die Aktivität der für die Biosynthese von PL entscheidenden Enzyme nach Inkubation mit verschiedenen Metaboliten aus S.arenae getestet werden.
Rohextrakt aus Zellen, die in komplexem Medium angezogen worden waren, wurde mit den folgenden Substanzen 30 min vorinkubiert und anschließend auf HMG-CoA Reduktase Aktivität getestet:

40 mM Mevalonsäure
4 mM PL-F-Diol
10 µg einer unbekannten Substanz*, aus S.arenae
0.2 mM Pentalenen
40 mM Humulen

Mit Ausnahme des Testansatzes, dem Mevalonsäure zugefügt worden war, ergaben sich in allen Fällen fast identische Aktivitäten. Eine geringe Hemmung durch Mevalonsäure ließ sich bei Wiederholungsversuchen nicht in allen Fällen reproduzieren. Nach diesem Ergebnis kann nicht von einer Produkthemmung der HMG-CoA Reduktase gesprochen werden.

---

* Die unbekannte Substanz war auf der Suche nach niedermolekularen Differenzierungsfaktoren aufgrund ihres Anfärbeverhaltens (35) mit Anisaldehyd (gelb) und Ehrlichs Reagenz (rot) aus dem Kulturfiltrat von S.arenae gereinigt worden. Sie zeigte im Test mit A-Faktor negativen Stämmen (Knoblauch-Faktor bei S.griseus) keine Wirkung als Differenzierungsfaktor.

3.6.2 Untersuchung der Farnesylpyrophosphat Zyklase

Die Farnesylpyrophosphat Zyklase ist als sehr instabil beschrieben. Nach Cane und Tillman (18) ging die Aktivität im Rohextrakt aus Streptomyces UC 5319 bei +4°C innerhalb von 4 h verloren. Aus diesem Grund wurde bei der Durchführung von Hemmversuchen mit verschiedenen Substanzen auf eine Vorinkubation verzichtet und gleichzeitig mit den untersuchten Substanzen das Substrat Farnesylpyrophosphat zugegeben.

Als Metabolite wurden untersucht:

		% Aktivität
16 µM	i.T. HMG-CoA	100
1 mM	i.T. Mevalonsäure	100
30 µM	i.T. PL-Chlorhydrin	89
1 mg	i.T. unbekannte Substanz*	70
20 µM	i.T. Pentalenen	105
300 µl	Lipidextrakt aus S.a.	41
10 µl	Humulen	102

Das Testvolumen betrug 25 ml.

Folglich hemmte sowohl der Lipidexrakt als auch PL-Chlorhydrin und die noch nicht identifizierte Substanz die Aktivität der FPP-Zyklase. Pentalenen als direktes Produkt des Enzyms erhöhte dagegen die Aktivität scheinbar geringfügig, was aber wohl eher auf seiner Funktion als Trägersubstanz bei der Trennung beruhen dürfte. Auch Humulen hemmte die Enzymaktivität nicht.
Weiter wurde nun versucht, Pentalenolacton-Chlorhydrin und die nicht identifizierte Substanz in solchen Mengen in den Test einzusetzen, daß eine vergleichbare Hemmung des Enzyms erfolgen sollte. In einem Testvolumen von 25 ml Rohextrakt wurden mit 0.8 mg PL-Chlorhydrin 50% und mit 0.25 mg der unbekannten Substanz 31% Aktivtät gefunden. Da aus diesem Ergebnis hervorging, daß die unbekannte Substanz ein stärkerer Inhibitor der FPP-Zyklase als PL-Chlorhydrin war, wurde zum einen die Identifizierung der Substanz versucht (siehe 3.7.6) und zum anderen die

Hemmung der FPP-Zyklase mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz bestimmt, deren Verlauf in Abb. 36 dargestellt ist. Der Verlauf der Hemmkurve hängt zweifellos mit dem Problem der gleichzeitigen Inkubation des enzymatischen Tests mit Substrat und Inhibitor zusammen, die aufgrund der Instabilität der Enzymaktivität notwendig schien. Aufgrund der fehlenden Vorinkubation ist nur eine unvollständige Hemmung der Enzymaktivität möglich.
Während die Konzentration von PL-Chlorhydrin, die im FPP-Zyklase-Test eine Hemmwirkung besitzt, deutlich über den Konzentrationen lag, die in Fermentationen erreicht wurde, war die Hemmwirkung der unbekannten Substanz so groß, daß mit einer Hemmung der FPP-Zyklase in vivo gerechnet werden muß, sofern sie in vergleichbarer Menge wie PL vorliegt und sofern die intrazellulären Konzentrationen mit denen im Kulturfiltrat vergleichbar sind. Allerdings können über die Konzentration der Substanz im Kulturfiltrat und in der Zelle noch keine Angaben gemacht werden.
Aufgrund der Eigenschaften der Substanz wurde die Hypothese aufgestellt, daß sie ein Folgeprodukt von PL sein könnte. Diese Hypothese sollte durch Verfütterung von ^{3}H-PL-Chlorhydrin an eine PL-verstoffwechselnde Kultur und durch Strukturaufklärung überprüft werden (siehe 3.7.6).

Ein weiteres Ergebnis dieser Hemmversuche war außerdem, daß weder Humulen noch Pentalenen eine Hemmung der entscheidenden Biosyntheseenzyme von PL bewirkte. Damit muß für die Hemmung der PL-Bildung nach Zugabe von Humulen oder Squalen eine andere Erklärung gesucht werden.

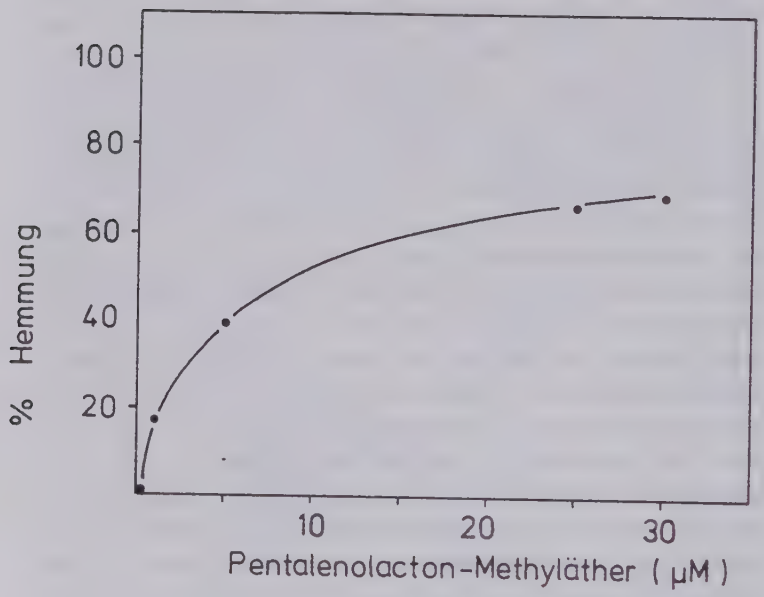


Abb. 36 :
Hemmung der FPP-Zyklase durch PL-Methyläther bei gleichzeitiger Inkubation des Rohextrakts aus S.arenae mit dem Hemmstoff und dem Substrat tt-Farnesylpyrophosphat
Der Rohextrakt wurde aus den Zellen einer Kultur in Minimalmedium nach 40 h Kultur gewonnen. 100 % Aktivität entsprachen 8.6 pMol/min /mg

3.7 Strukturaufklärung des Hemmstoffs der FPP-Zyklase

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Pentalenolacton und dem unbekannten Hemmstoff der FPP-Zyklase aufzuklären, wurde untersucht, ob ^{3}H-markiertes Pentalenolacton (Chlorhydrin) durch Zellen von S.arenae TÜ 469 in einem späten Wachstumsstadium zur gesuchten Substanz metabolisiert würde. Die zugrundeliegende Hypothese ging von der Substanz als einem Folge- oder Abbauprodukt von PL aus. Voraussetzung bei diesem Versuch war jedoch, daß die ^{3}H-Markierung der OH-Gruppe des PL-Chlorhydrins bei einer derartigen Umwandlung erhalten blieb. Als Analysenmethode wurde die Auftrennung von Chloroformextrakten des Kulturfiltrats über HPLC gewählt. Mit Methanol:Wasser 1:2 (pH 2.7) besaß die zu untersuchende Substanz bei Auftrennung unter den beschriebenen Bedingungen (siehe 2.4.4.1) über Lichrosorb RP 18 eine Retentionszeit von 19 - 21 min, während PL-Chlorhydrin nach ca. 45 min eluiert wurde.

500 µl ^{3}H-PL-Chlorhydrin wurden zu 500 ml einer 90 h Kultur in Minimalmedium zugegeben. Nach 4, 9, 24 und 48 h wurden jeweils 100 ml der Kultur steril entnommen, mit 2 ml 6 M Schwefelsäure angesäuert und dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wurde in 2 ml Methanol aufgenommen und 90 µl davon über HPLC aufgetrennt. Die UV-Detektion erfolgte bei 225 nm, die Radioaktivität wurde in 0.5 min.-Fraktionen ausgezählt. Der Verlauf des Chlorhydrinabbaus geht aus Abb. 37 hervor. Offensichtlich erfolgte die Verstoffwechslung von PL sehr schnell und führte zu einer größeren Anzahl von Abbauprodukten. Allerdings muß hierbei berücksichtigt werden, daß PL-Chlorhydrin möglicherweise kein physiologisches Produkt der PL-Synthese darstellt und daß auch ein Transfer der ^{3}H-Markierung nachgewiesen würde, sofern er mit einem anderen Terpenderivat erfolgt. Ein derartiger Austausch findet jedoch eher mit Wasser als mit anderen PL-Derivaten statt.

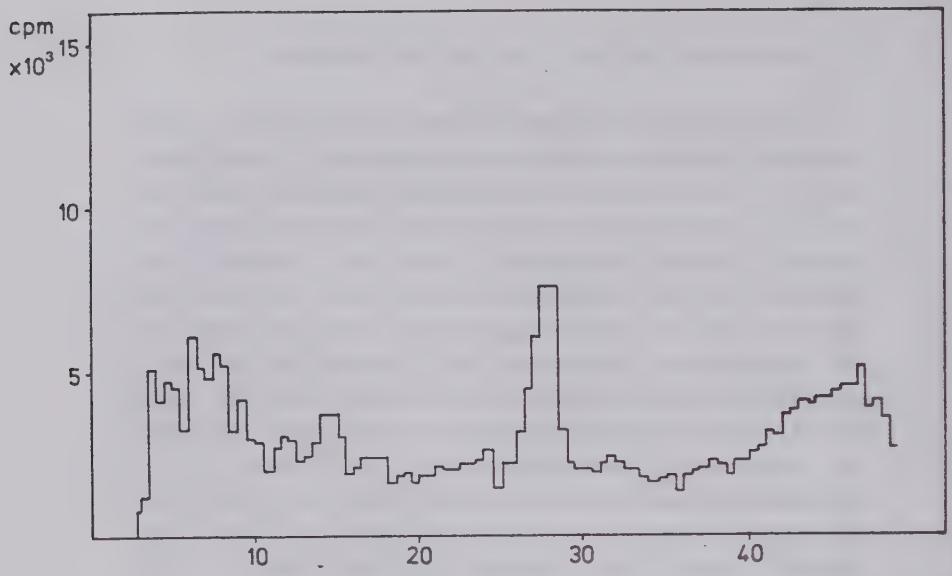


Abb. 37a

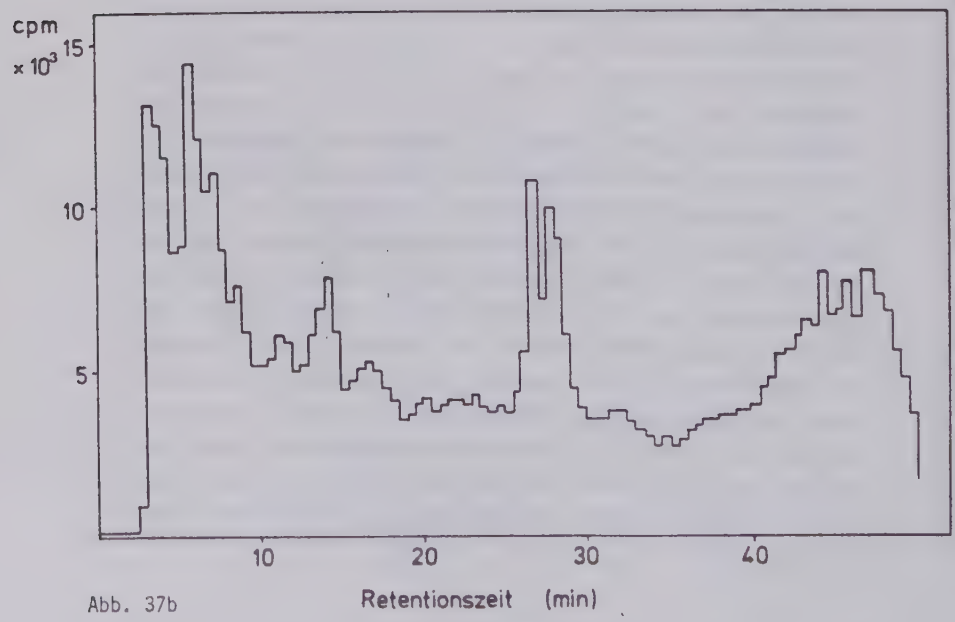


Abb. 37b

Legende zu Abb. 37 a-d siehe S. 130

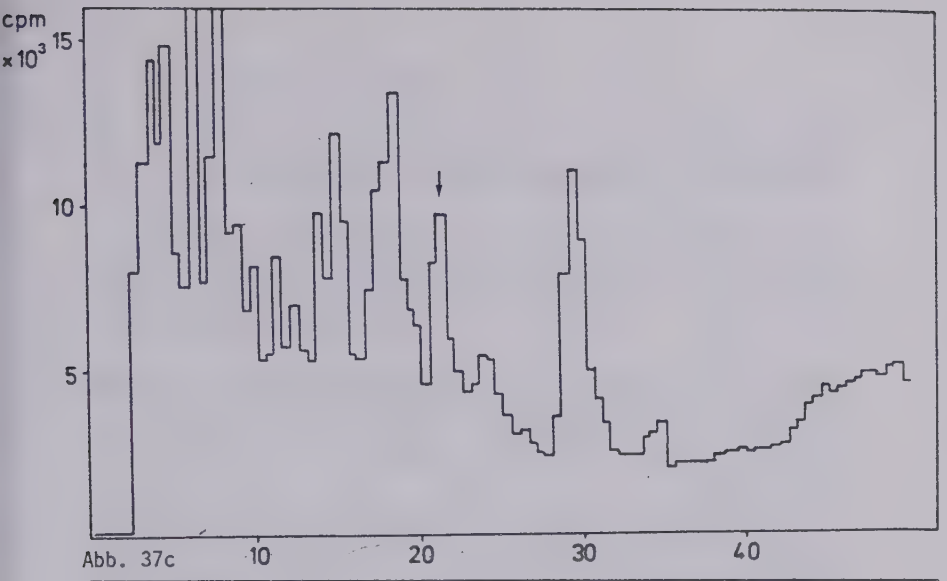


Abb. 37c

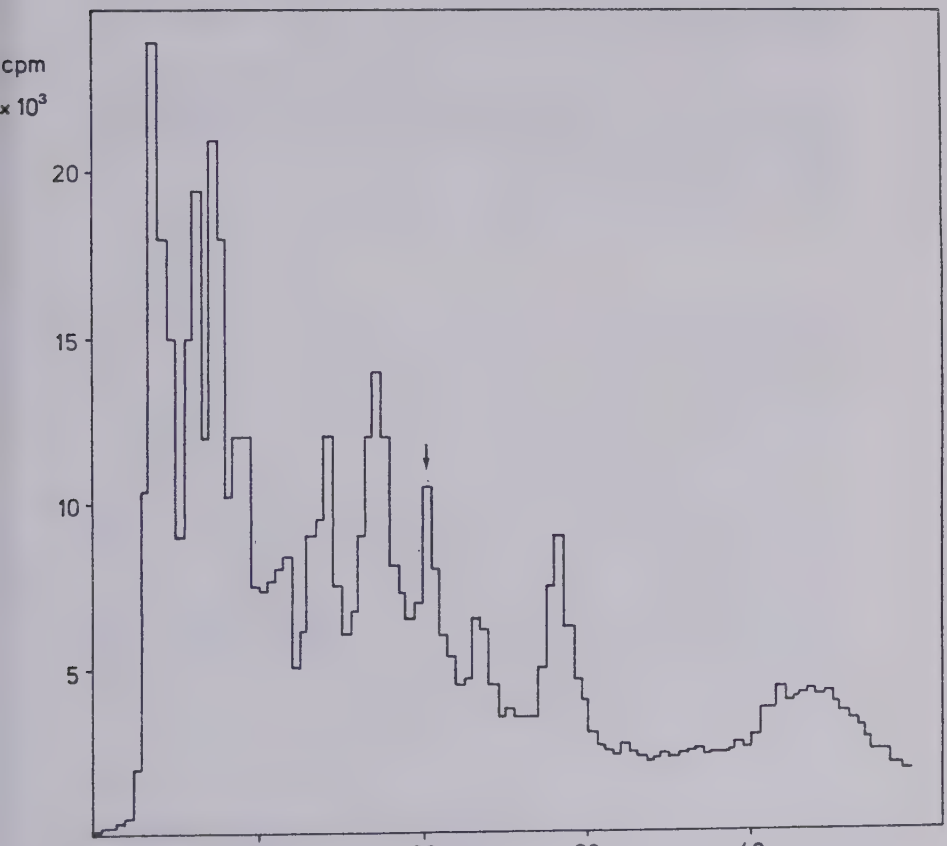


Abb. 37d

Abb. 37 (a - d):
Auftrennung der Pentalenolacton-Folgeprodukte über HPLC

^{3}H-PL (Chlorhydrin, Arenaemycin C, Markierung an C-9 OH-Gruppe) wurde einer 120 h Minimalmedienkultur verfüttert und die Abbauprodukte nach 4, 8, 24 und 48 h aus dem Kulturfiltrat mit Chloroform extrahiert und über HPLC analysiert. (Lichrosorb RP 18, 10 µ, analytische Säule siehe 2.4.4.1, Eluent: Methanol:H_2O 1:2, pH 2.7) Die Detektion erfolgte aufgrund der Radioaktivität in 0.5 min-Fraktionen. Die Abbildungen 37 a - d entsprechen 4, 8, 24 und 48 h Inkubationszeit.
PL-Chlorhydrin besitzt unter den angegebenen Bedingungen der Chromatographie eine Retentionszeit von 40 - 45 min, der Hemmstoff der Farnesylpyrophosphat Zyklase wurde nach 20 - 21 min eluiert (siehe Pfeil beim entsprechenden Peak des Chromatogramms).
Aus der Kinetik des Abbaus von Pentalenolacton geht hervor, daß die Verbindung mit der Retentionszeit 28 min eines der primären Produkte aus PL-Chlorhydrin darstellen muß, da sie bereits nach 4 - 8 h in größerer Menge nachweisbar war.

Aus dem Ergebnis des Versuchs in Abb. 37 läßt sich schließen, daß tatsächlich die Möglichkeit besteht, daß der Hemmstoff der FPP-Zyklase aus PL gebildet werden kann, da nach 48 h Inkubation eine ^{3}H-markierte Substanz mit dem gleichen Elutionsverhalten wie der Inhibitor nachgewiesen werden konnte. Die Bildung der Substanz erfolgte allerdings erst relativ spät, verglichen mit einer ganzen Anzahl weiterer Abbauprodukte von ^{3}H-PL, die bisher noch nicht identifiziert wurden.

Nachdem im vorangegangenen Versuch der Hemmstoff der FPP-Zyklase als mögliches Folgeprodukt von PL nachgewiesen werden konnte, sollte nun anhand verschiedener Spektren eine Identifizierung der Substanz versucht werden. Hierzu wurde ein UV-Sektrum, ein ^{1}H-NMR-Spektrum und ein IR-Spektrum aufgenommen. Im UV-Spektrum konnte ein Maximum bei 232 nm nachgewiesen werden. Die Existenz eines Sechsringlactons konnte aufgrund der typischen Banden bei 1750 cm^{-1} eindeutig nachgewiesen werden.
Das IR-Spektrum (siehe Abb. 38) wies im übrigen große Ähnlichkeit mit den IR-Spektren von PL-Verbindungen auf. Hiermit stimmte auch eine beobachtete Hemmwirkung auf die GAPDH aus Kaninchenmuskel überein, die allerdings geringer ist als beim PL-Epoxid. Eine Bestimmung der relativen Hemmwirkung konnte bisher noch nicht vorgenommen werden.
Aufgrund des ^{1}H-NMR-Spektrums (Abb. 39) konnte die Substanz vorläufig als PL-Methyläther identifiziert werden. Diese Struktur bedarf allerdings noch der Bestätigung durch Elementaranalyse, Massenspektren und weitere NMR-Spektren. Diese Untersuchungen scheiterten bisher an mangelnden Substanzmengen sowie an der großen Instabilität der Substanz. Wie schon unter 2.4.5.2 beschrieben, scheint der PL-Methyläther bei der Auftrennung über HPLC und anschließender Trocknung sehr schnell in verschiedene andere Substanzen zu derivatisieren. Diese Instabilität übertrifft die bei PL (Diol und Chlorhydrin) beobachtete Instabilität bei weitem. Es sollte deshalb zur weiteren Bestätigung der Struktur die Isolierung der Substanz als Methylester erwogen werden.

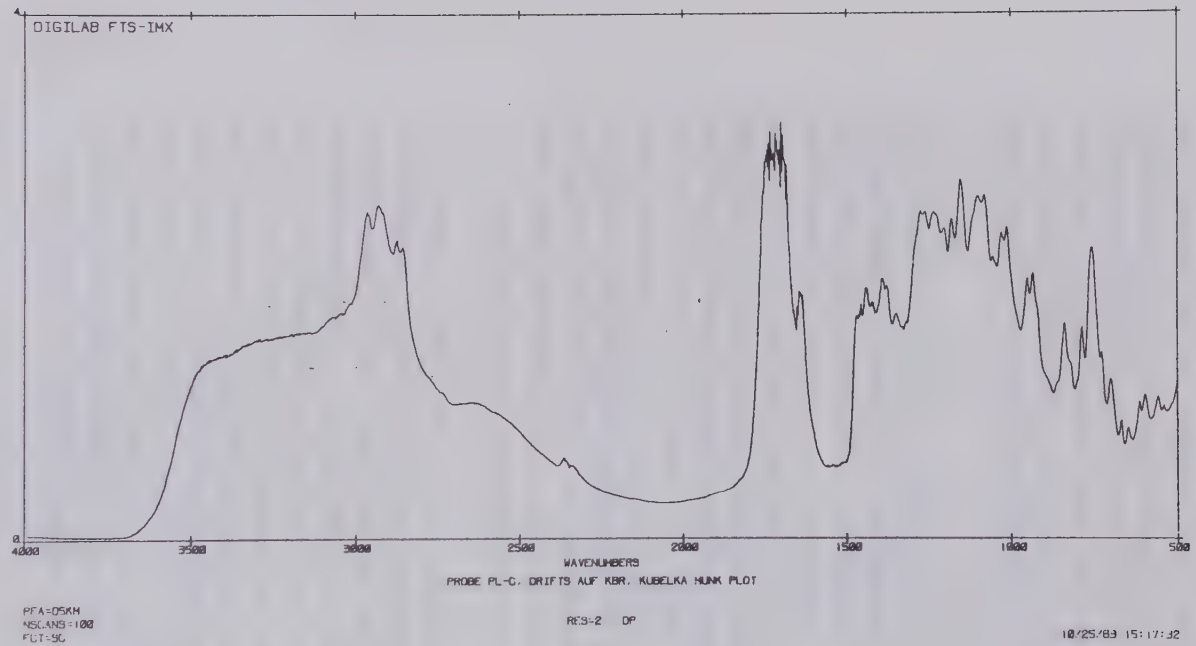


Abb. 38 a:
FTIR-Spektrum von Pentalenolacton-Chlorhydrin (Arenaemycin C) auf KBr

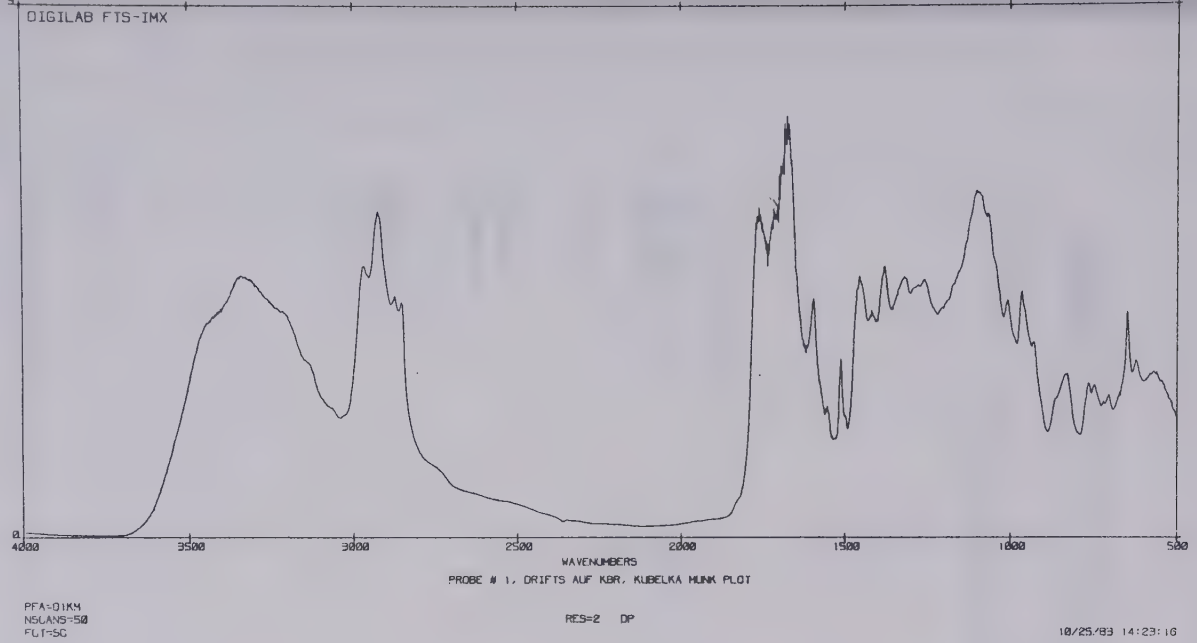


Abb. 38 b:
FTIR-Spektrum des Hemmstoffs der Farnesylpyrophosphat Zyklase
(Pentalenolactonmethyläther) auf KBr

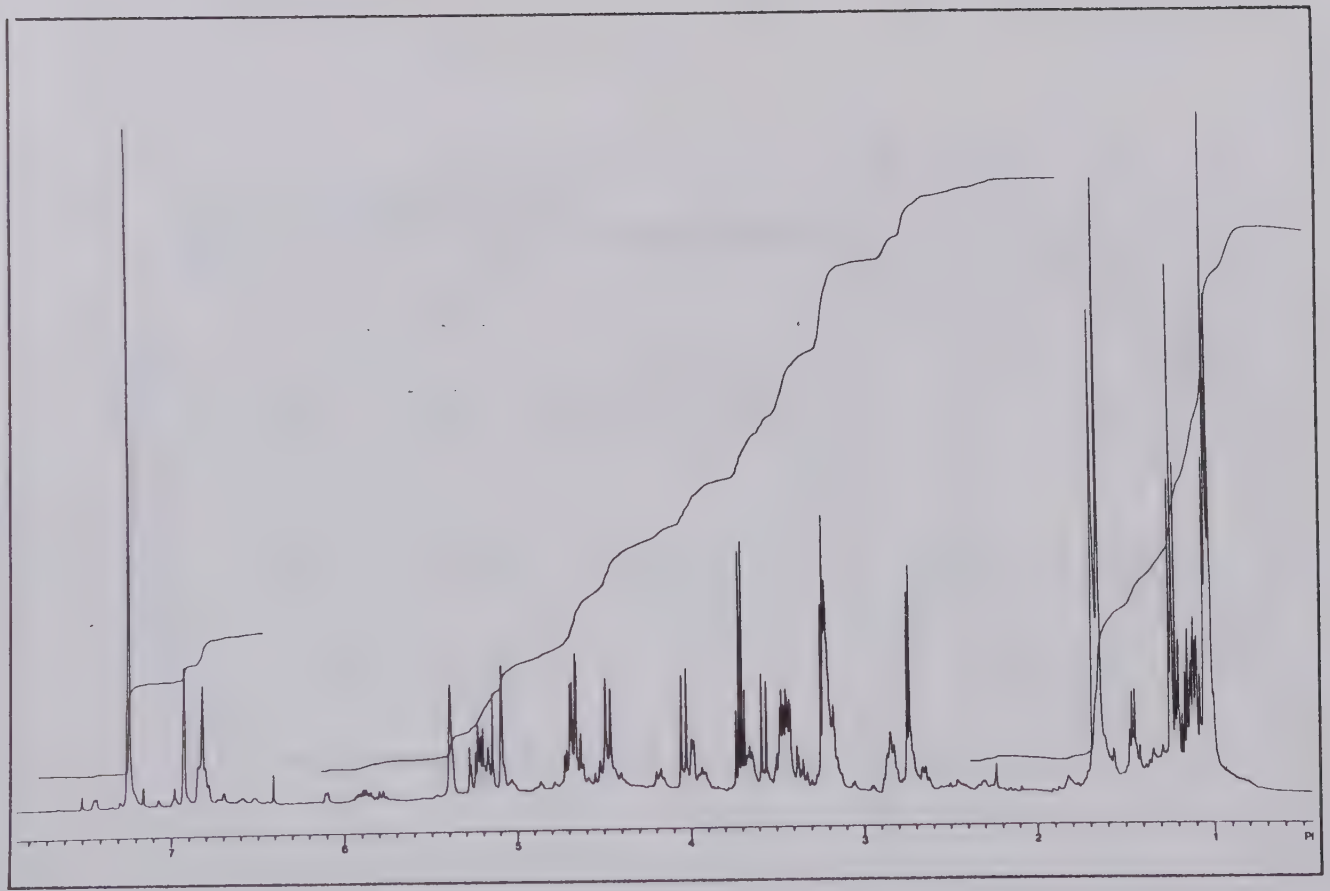


Abb. 39 a: ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz) von Pentalenolacton-Chlorhydrin (Arenaemycin C) in $CDCl_3$

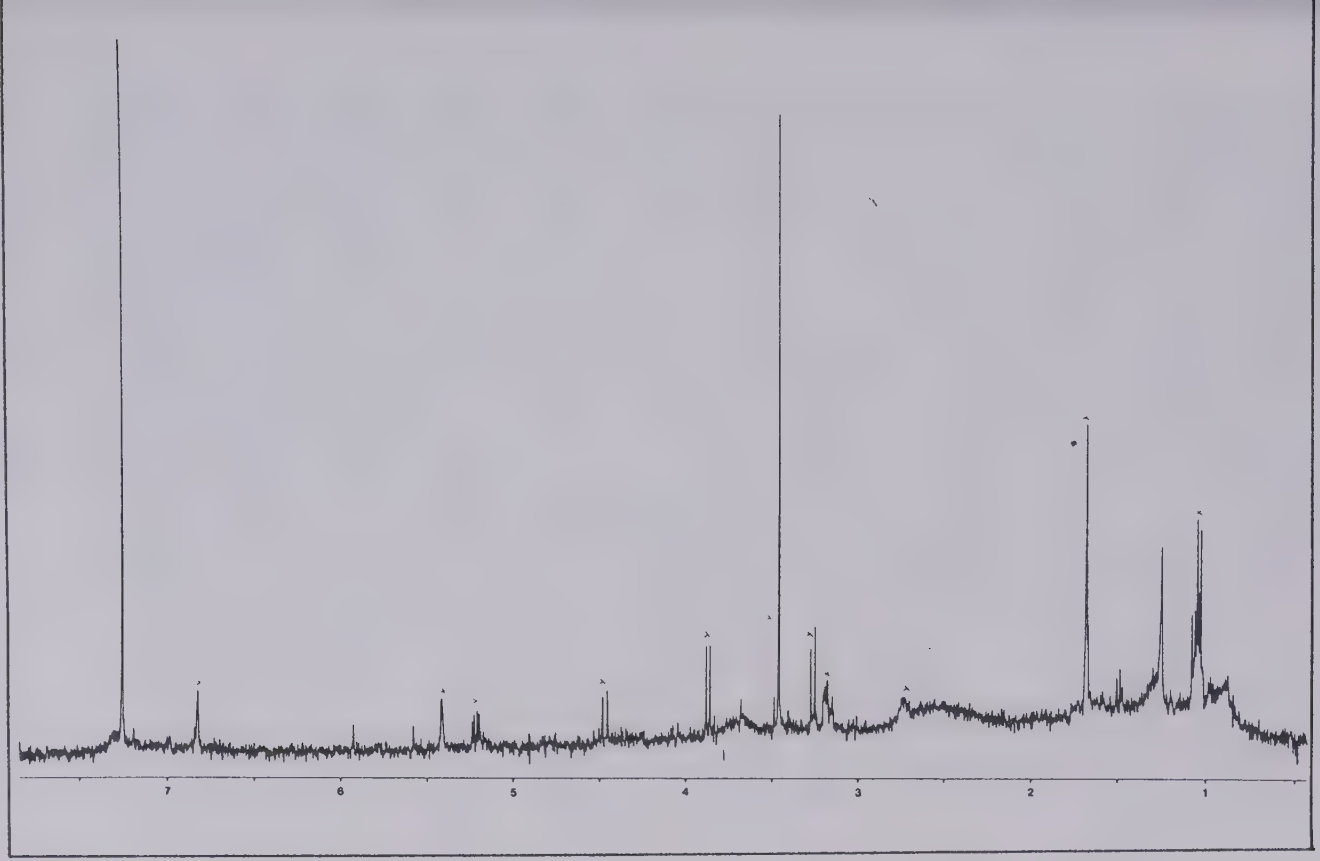


Abb. 39 b: ^{1}H-NMR-Spektrum (400 MHz) des Hemmstoffs der Farnesylpyrophosphat Zyklase in $CDCl_3$

Sofern sich die in Abb. 40 dargestellte Struktur bestätigen läßt, muß von der Existenz einer O-Methyltransferase als PL-metabolisierendem Enzym ausgegangen werden, da durch das Ergebnis des Verfütterungsexperiments ein Aufarbeitungsartefakt weitgehend ausgeschlossen werden kann. O-Methyltransferasen sind seit längerem als Biosyntheseenzyme von verschiedenen Sekundärmetaboliten bekannt (22).

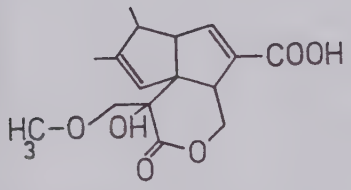


Abb. 40 Pentalenolacton-methyläther

4. Diskussion

4.1 Problematik des pelletartigen Wachstums von S.arenae TÜ 469 unter Minimalmedienbedingungen

Ein Problem bei der Optimierung der Kulturbedingungen und bei der Untersuchung von Enzymaktivitäten von S.arenae besteht darin, daß der Organismus alle Merkmale pelletartigen Wachstums zeigt. Durch häufige Querverzweigung der Zellen erfolgt hierbei die Ausbildung von kugelförmigen Mycelstrukturen (Pellets), in denen aufgrund von Substrat- und Sauerstoffverarmung das Absterben und die Autolyse von Zellen beobachtet wird (43,113). Dadurch, daß absterbende Zellen zur gleichen Zeit wie wachsende Zellen auftreten, liegen physiologisch heterogene Kulturen vor. Zudem können durch Freisetzung des Zellinhalts lysierender Zellen auch Enzyme freigesetzt werden, die den Abbau oder die Inaktivierung gebildeter Antibiotika katalysieren.

Aufgrund der physiologischen Heterogenität wird die Messung von spezifischen Enzymaktivitäten und die Verwendung des Trockengewichts der Zellen als Parameter für das Zellwachstum in ihrer Aussagekraft stark eingeschränkt. Deshalb wurde der Protein- und der DNA-Gehalt der Kulturen als Parameter für das Zellwachstum getestet. Da deren Verlauf weitgehend mit der Entwicklung der Biotrockenmasse übereinstimmte, konnte diese weiterhin als Maß für das Zellwachstum genommen werden.

Da ein Ziel der Arbeit darin bestand, die Produktion von PL von S.areae TÜ 469 zu steigern, sollte versucht werden, durch Verkleinerung der Pellets oder durch Verhinderung der Pelletbildung eine höhere Produktion zu ereichen.

Eine solche Verminderung der Pelletbildung kann z.B. durch Scherkräfte erreicht werden. Lehmann et al. stellten Untersuchungen zum Produktionsverhalten von S.arenae TÜ 469 in Fermentern an, in denen durch unterschiedliche Rührgeschwindigkeit einerseits die Morphologie der Pellets verändert wurde, andererseits allerdings auch eine unterschiedliche Sauerstoffversorgung vorlag (55). Wurden die Zellen im Fermenter bei hoher Umdrehungszahl des Blattrührers durch die auftretenden Scherkräfte zu Filamenten

zerschlagen, so verlief die spezifische Produktbildungsrate auf einem konstanten, aber äußerst niedrigen Niveau. Infolge des starken Zellwachstums stieg die volumenbezogene Produktion hierbei auf annähernd gleiche Werte an, wie sie auch in Schüttelkulturen gefunden wurden.

Der fast konstante Wert der spezifischen Produktbildungsrate beim stark gerührten Fermenter belegt den direkten Zusammenhang zwischen Wachstum und Produktion. Unter diesen Bedingungen sollten eigentlich physiologisch einheitliche Kulturen vorliegen. Da durch die Wirkung der Scherkräfte aber sehr viele zerstörte und geschädigte Zellen resultierten, sind auch hier Einschränkungen zu machen.

Das Maximum der spezifischen Produktbildungsrate zu Beginn der Produktion einer Schüttelkultur oder einer schwach gerührten Fermenterkultur stimmt möglicherweise mit einem Stadium der Pelletmorphologie überein, in dem der Anteil vitaler Zellen am größten ist. Eine andere Möglichkeit der Interpretation könnte darin bestehen, daß das Maximum der spezifischen Produktbildungsrate mit einer bestimmten Stoffwechsellage in den Zellen zusammenhängt. Hierfür könnte auch die Übereinstimmung des Verlauf der spezifischen Aktivität der FPP-Zyklase mit der spezifischen Produktionsbildungsrate sprechen.

Ein Verlauf der Produktbildungsrate, wie er bei S.arenae beobachtet wurde, tritt auch bei anderen in Pelletform wachsenden Antibiotikaproduzenten auf (113).

Eine weitere Möglichkeit, weitgehend filamentöses Wachstum zu erreichen , wird am Beispiel der Kultur von S.arenae in Wickerham Medium deutlich. Da in komplexen Medien nur eine geringe Pelletbildung beobachtet wurde, sollte versucht werden, durch eine Veränderung des Produktionsmediums eine Änderung der Mycelstruktur zu erreichen. Mit Sojamehl als N-Quelle wurde versucht, S.arenae in Submerskulturen zur PL-Bildung zu bringen, ohne daß gleichzeitig Pelletbildung erfolgt. Die Pelletbildung konnte zwar verhindert werden, gleichzeitig unterblieb jedoch die Produktion von PL.

Außerdem wurde nach Kendrick und Ensign (50) versucht, durch Zusatz von 5% Polyäthylenglykol (PEG) und einer Metallspirale in

der Schüttelkultur eine feinere Mycelstruktur zu erhalten. Hierbei zeigte sich, daß S.arenae TÜ 469 PEG als C-Quelle verstoffwechseln konnte. Zwar wurde auch hierbei das Ziel einer besseren Dispersion erreicht, dafür war jedoch die PL-Bildung weitgehend gehemmt.
Nach den geschilderten Versuchen könnte postuliert werden, daß das Wachstum von S.arenae , sofern es durch die Stickstoffquelle limitiert ist, sowohl die Pelletbildung als auch eine maximale spezifische PL-Bildungsrate ermöglicht. Eine Möglichkeit zur Optimierung von Fermentationen zur PL-Gewinnung könnte möglicherweise darin bestehen, daß eine komplexe Stickstoffquelle wie z.B. Sojamehl der Kultur kontrolliert über die gesamte Fermentation verteilt zugesetzt wird.

4.2 Regulation der GAPDH - Isoenzyme

Alle Versuche, eine proteasekatalysierte Interkonversion PL-sensitiver GAPDH in die insensitive Form nachzuweisen, blieben erfolglos. Angesichts des Verlaufs der Proteinsynthese einer Minimalmedienkultur war dieses Ergebnis relativ wahrscheinlich, da eine derartige Interkonversion nur in stationären Zellen sinnvoll zu sein scheint. Da der Proteinabbau anscheinend auch in Bakterien bestimmten Bereichen der Zelle zugeordnet werden kann (111), wäre ein Mechanismus sehr unwahrscheinlich, bei dem eine PL-sensitive Untereinheit gebildet und in den Bereich proteolytischen Abbaus transportiert würde. Dort müßte ein Angriff spezifischer Proteasen erfolgen, worauf die Untereinheiten der nunmehr PL-insensitiven GAPDH sich zum oktameren Enzym zusammenlagerten. Bei Bakterien sind bisher keine Enzymmodifikationen durch spezifische, limitierte Proteolyse bekannt.
Allerdings wäre der Fall denkbar, daß PL-sensitive GAPDH nach Inaktivierung durch PL anschließend beschleunigt abgebaut wird. Dieser Abbau könnte sogar im Zusammenhang mit der ungeklärten Frage stehen, wie die Zelle die Synthese PL-insensitiver GAPDH mit der PL-Bildung reguliert und gleichzeitig die Synthese PL-sensitiver GAPDH einstellt.

Bei limitierter Proteolyse mit Clostripain und Papain ergab sich eine weitgehende Übereinstimmung der Bruchstücke der Streptomyceten-GAPDHs nach Spaltung mit Papain. Hierbei konnte nur jeweils ein unterschiedliches Bruchstück nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnten beim Verdau mit Clostripain gemeinsame Peptide der PL-sensitiven GAPDH sowohl mit PL-insensitiver GAPDH als auch mit GAPDH aus Kaninchenmuskel nachgewiesen werden. Eine weitere Analyse der PL-insensitiven GAPDH mit genetischen und gentechnologischen Methoden scheint ein interessanter Ansatz zu sein, die spezifische Inaktivierung von GAPDH durch PL weiter aufzuklären. Da die bisher nachgewiesenen Antibiotika-insensitiven Proteine in Produzenten meist ribosomale Proteine waren, gibt es bisher kaum Literatur über Regulationen, die mit der GAPDH-Regulation in S.arenae TÜ 469 vergleichbar wären.

4.3 Diskussion der Medienoptimierung und der Verfütterung von Vorstufen

Die Verfütterung von Vorstufen der Sesquiterpensynthese erbrachte keinen Fortschritt im Sinn einer Ausbeutesteigerung. Ganz offensichtlich sind außer Leucin bzw. Ketoisocaproat nur noch Humulen und Pentalenen verstoffwechselbar. Bei allen anderen untersuchten Vorstufen kann eine Verwertung offenbar aufgrund von Permeationsbarrieren nicht erfolgen.

Zur Erklärung der Hemmung der PL-Bildung nach Zugabe von Humulen oder Squalen gab es zunächst mehrere Möglichkeiten, darunter z.B. erschwerten Sauerstofftransport, oberflächenaktive Wirkung oder Hemmung von Biosyntheseenzymen. Nachdem das Trockengewicht der Zellen nur geringfügig geringer war als in den Kontrollkulturen, konnte von einem unspezifischen Effekt auf das Wachstum nicht mehr ausgegangen werden. Daraufhin wurde Humulen dem HMG-CoA Reduktase Test und dem FPP-Zyklase Test zugesetzt. Hierbei bewirkte es in beiden Fällen keinerlei Hemmung der gemessenen Aktivitäten. Aus diesem Grund muß angenommen werden, daß Verbindungen wie Humulen oder Squalen von unspezifischen Oxygenasen umgesetzt werden, deren physiologisches Substrat, zumindest wäh-

rend bestimmter Wachstumsphasen, das Pentalenen darstellt. Eine weitere Unterstützung dieser Hypotese lieferten Vorversuche, in denen dem Minimalmedium 5% Polyäthylenglykol (MW 6000) und eine Metallspirale zur besseren Dispersion des Mycels zugesetzt worden waren. Unter diesen Bedingungen war S.arenae in der Lage, PEG abzubauen und zu verstoffwechseln, was sich in einer Zunahme des Zelltrockengewichts bemerkbar machte. Gleichzeitig war wiederum eine stark verminderte PL-Bildung zu beobachten. PEG-verstoffwechselnde Bakterien sind in der Literatur beschrieben (48) Es ist möglich, aus ihnen eine membrangebundene PEG-Dehydrogenase zu isolieren, die mit Laurylbetain solubilisiert werden kann. Ähnliche PEG- und Terpen-oxidierende Enzyme müssen auch in S.arenae TÜ 469 vorliegen. Wie aus dem Spektrum verstoffwechselbarer Verbindungen hervorgeht, zeichnen sie sich durch geringe Substratspezifität aus. Eine Pentalenen Dehydrogenase müßte demnach nicht unbedingt mit Pentalenen als Substrat getestet werden, sondern könnte auch über ihre Aktivität gegenüber Humulen oder PEG detektiert werden. Bei hohen Konzentrationen von Humulen in der Zelle werden diese oxidierenden Enzyme, die ansonsten die PL-Bildung vermutlich nicht limitieren, kompetitiv gehemmt. Daraus könnte die verminderte PL-Bildung resultieren und möglicherweise auch eine intrazelluläre Anhäufung von Pentalenen. Der Nachweis oder die Isolierung von Pentalenen in einer Kultur mit 5% PEG könnte somit erfolgreicher verlaufen als die bisher durchgeführten Versuche unter Produktionsbedingungen. Die geringe nachweisbare Menge von Pentalenen in den Zellen und die hohe Aktivität oxidierender Enzyme mit zugesetztem Humulen liefern weitere Indizien dafür, daß diese Enzyme die PL-Synthese normalerweise nicht limitieren. Angesichts der Beobachtung, daß Humulenoxide als Reaktionsprodukte dieser Enzyme in solcher Menge gebildet werden, daß sie dünnschichtchromatographisch gut nachzuweisen waren, könnte vermutet werden, daß diese Reaktionsprodukte aufgrund von oberflächenaktiven Eigenschaften die geringe Hemmung des Zellwachstums verursachen. Nach der Hemmung der PL-Bildung durch Phenobarbital kann zwar davon ausgegangen werden, daß in S.arenae kein Phenobarbital-induzierbares Cyt-P-450-System wie in B.megaterium (66) vorhanden ist. Es ist jedoch durchaus möglich, daß an der

Oxidation von Pentalenen zu PL ähnliche Enzymsysteme beteiligt sind, wie sie für Pseudomonas oleovorans beschrieben wurden (84). Diese setzen sich aus drei Proteinkomponenten zusammen und hydroxylieren mit geringer Spezifität Fettsäuren und Alkane unter Verbrauch von O_2 und NADH. Da diese Proteine sehr viel Eisen enthalten, wäre damit u.U. sogar eine Erklärung für die positive Wirkung von Fe^{2+} auf die PL-Produktion möglich.

Die Wirkung der untersuchten Metallsalze beruht hauptsächlich auf einer Wachstumsförderung unter definierten Bedingungen. Dies geht auch aus den relativ konstanten Werten von 800 - 1000 µg PL/g Trockengewicht hervor, die bei diesen Optimierungen gemessen wurden. Wie bereits erwähnt, hängt die PL-Bildung in Minimalmedium direkt mit dem Wachstum zusammen. Im Fall der Ca^{2+}-Optimierung könnte die beobachtete größere PL-Konzentration im Kulturfiltrat auch im Zusammenhang mit größerer Permeabilität der Cytoplasmamembran stehen, wodurch die Freisetzung von Pentalenolacton erleichtert werden würde.
Aufgrund der Literatur war eine höhere Produktion durch Optimierung der Eisensulfatkonzentration durchaus erwartet worden (112). Dagegen blieben Co^{2+} und Mn^{2+} ohne Effekt auf die gebildete PL-Menge. Bei Zink konnte nur die grundsätzliche Notwendigkeit für die PL-Produktion, nicht jedoch eine optimale Menge gefunden werden.

Die untersuchten C-Quellen waren ohne große Wirkung auf die PL-Bildung, wenn man von den Ausnahmen absieht, die entweder wie Pyruvat (116) oder Ketoisocapronat im Zusammenhang mit der Synthese von Aminosäuren stehen, oder die (s.o.) von oxidierenden Enzymen der PL-Biosynthese umgesetzt werden.

4.4 Diskussion der gemessenen Aktivitäten von PL-Biosynthese-enzymen

Beim Vergleich der Enzyme der Isoprenoidsynthese in S.arenae mit Enzymen aus anderen Quellen, die in der Literatur beschrieben sind, fällt zunächst die Übereinstmmung der Eigenschaften der IPP-Isomerase und der FPP-Synthetase auf. Die Aktivität der Dimethylallyltransferase und Geranyltransferase (FPP-Synthetase) scheint auf einem Enzym lokalisiert zu sein Dies wird durch den identischen Verlauf beider Aktivitäten während einer Kultur belegt. Die Aktivität ist durch Jodacetamid hemmbar. Das offenbar einzige Produkt der Reaktion ist trans-trans-Farnesylpyrophosphat: dieses wird durch die Reaktion von einem Molekül DMAPP mit zwei Molekülen IPP synthetisiert. Alle diese Eigenschaften stimmen mit den beschriebenen Eigenschaften der FPP-Synthetase aus B.subtilis überein (103). Ein anderer Typ von Prenyltransferase wurde dagegen in Micrococcus luteus und M.lysodeicticus beschrieben. Dieses Enzym überträgt IPP auf DMAPP und auf FPP unter Bildung von Geranylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat. Diese Aktivität ist nicht durch Jodacetamid hemmbar (85).
Die FPP-Synthetase aus B.subtilis ist durch K^+ und NH^+_4 aktivierbar und zeigt in Anwesenheit von Detergentien gesteigerte Aktivität. Es wird dehalb angenommen, daß das Enzym in B.subtilis an Membranen assoziiert ist. Die Eigenschaften der Streptomycetenenzyme wurden in dieser Hinsicht noch nicht überprüft.

Die HMG-CoA Reduktase in S.arenae TÜ 469 zeigte keine ausgeprägte Substratspezifität bezüglich NADH oder NADPH, obwohl ein NADPH-regenerierendes System eine etwas höhere Aktivität bewirkte. Dies ist ein deutlicher Unterschied zum Enzym aus Eukaryonten (NADPH-abhängig, E.C. 1.1.1.34) und zum einzigen bisher untersuchten Enzym aus Prokaryonten, der NADH-spezifischen HMG-CoA Reduktase aus Pseudomonas sp. (E.C. 1.1.1.88)(82). Das Enzym aus Pseudomonaden wurde aus Zellen isoliert, die auf Mevalonsäure als einziger C-Quelle angezogen worden waren. Das Enzym kann aufgrund dieses Nährstoffangebots den oxidativen Abbau von Mevalonsäure katalysieren. Das Enzym aus Eukaryonten bevorzugt dagegen in

starkem Maß die Reduktion von HMG-CoA. Das Ausmaß der Reversibilität der Reaktion in S.arenae wurde nicht überprüft. Aus der Beobachtung, daß Mevalonsäure nicht in die Sesquiterpene eingebaut werden kann, kann eine mögliche Reversibilität der HMG-CoA Reduktase Reaktion in S.arenae nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Untersucht wurde dagegen die Lokalisation des Enzyms in S.arenae. Alle erhaltenen Ergebnisse deuteten auf die Löslichkeit der Enzymaktivität hin. Diese Eigenschaft weist auch das Enzym aus Pseudomonas auf, während die HMG-CoA Reduktase in Eukaryonten membrangebunden auftritt.

Zur Regulation der NADH-abhängigen HMG-CoA Reduktase ist wenig bekannt, wenn man von der Induzierbarkeit durch Mevalonsäure absieht (82). Dagegen ist die Regulation der HMG-CoA Reduktase (E.C. 1.1.1.34), besonders im Fall des Enzyms aus der Säugetierleber, sehr gut untersucht (30). Dieses Enzym unterliegt in der Rattenleber einer Tagesrhythmik, dem Einfluß verschiedener Effektoren und Hormone, einer Feedbackrepression durch Cholesterin und durch andere Produkte des Stoffwechselwegs sowie dem Einfluß verschiedener Systeme, die die Aktivität des Enzyms z.B. durch Phosphorylierung-Dephosphorylierung beeinflussen.

Der Effekt einer Feedback-Hemmung, wie er beim Säugetier z.B. durch Cholesterin auftritt, schien am ehesten auf die Regulationsmöglichkeit einer Bakterienzelle übertragbar zu sein. Es wurden deshalb verschiedene Substanzen des PL-Synthesewegs in den Test der HMG-CoA Reduktase aus S.arenae eingesetzt, darunter auch ein ungereinigter Lipidextrakt. Da mit Ausnahme einer geringen Hemmung durch Mevalonsäure kein Hemmeffekt zu beobachten war, kann eine Feedback-Hemmung im untersuchten Fall vermutlich ausgeschlossen werden. Dagegen kann eine Feedback-Repression durch PL oder andere Isoprenoide in S.arenae nicht ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang muß auf die abnehmende Aktivität der HMG-CoA Reduktase Aktivität mit zunehmender PL-Bildung hingewiesen werden. Insgesamt kann jedoch ausgesagt werden, daß die reduktive Umsetzung von HMG-CoA zur Mevalonsäure vermutlich durch Regulation der Enzymmenge und nicht der Enzymaktivität gesteuert wird, wobei nicht bekannt ist, inwieweit hierbei die Substratkonzentration zusätzlich limitierend wirkt.

Die Synthese von Isoprenoiden kann in S.arenae TÜ 469 sowohl von Acetoacetyl-CoA als auch von Ketoisocapronsäure als Vorstufe der Bildung von HMG-CoA ausgehen. Dieser Schluß muß unter Berücksichtigung der Ergebnisse der ^{13}C-Verfütterungsexperimente von Cane bei Streptomyces UC 5319 aus den Ergebnissen der Verfütterung von Leucin und Ketoisocapronsäure gezogen werden. Aufgrund der geringen nachweisbaren Pyruvat Dehydrogenase-Aktivität in S.arenae war zunächst vermutet worden, daß die Bildung von HMG-CoA nur von Ketoisocapronsäure ausgehen würde. Offensichtlich liegt eine hohe PDH-Aktivität nicht in allen Mikroorganismen vor. Z.B. wurde in Aspergillus parasiticus eine maximale PDH-Aktivität von 1 - 4 pMol/min/mg in Abhängigkeit vom Kulturmedium gemessen (110).
Nach Verfütterung von ^{14}C-markierten Verbindungen konnte in S.arenae TÜ 469 jedoch der Nachweis erbracht werden, daß Leucin und Ketoisocapronsäure in die Isoprenverbindungen von S.arenae eingebaut werden. Dies ist insofern von Bedeutung, als in Pflanzenzellen , den bestuntersuchten Terpenproduzenten, eine direkte Verwertung des aus Leucin gebildeten HMG-CoA im Mevalonsäureweg ausgeschlossen wurde, nachdem kein spezifischer Einbau von unterschiedlich markiertem ^{13}C-Leucin in die Sesquiterpene von Andrographis paniculata gefunden wurde (3). Als Ursache für dieses Verhalten wurde Kompartimentierung in der untersuchten Zellen angenommen, wodurch verschiedene HMG-CoA-Pools gebildet würden. Da in S.arenae TÜ 469 eine derartige Kompartimentierung weit unwahrscheinlicher ist, wäre es interessant, den Einbau spezifisch ^{13}C-markierter Ketoisocapronsäure in PL oder anderen Sesquiterpenen zu untersuchen. Das Problem mangelnder Produktmengen stellt derzeit das größte Hindernis für einen derartigen Versuch dar.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Aktivität der Farnesylpyrophosphat-Zyklase entscheidend für die Bildung von PL. Außer der höheren Aktivität der anderen an der Biosynthese beteiligten Enzyme spricht auch die Übereinstimmung von spezifischer Aktivität der FPP-Zyklase und der spezifischen Produktbildungsrate für diese These. Darüber hinaus kann beim Vergleich von Enzymaktivität und PL-Bildung einer Kultur Übereinstimmung bis in

den Bereich einer Zehnerpotenz abgeschätzt werden.
Aufgrund des völlig unterschiedlichen Verlaufs der spezifischen Aktivität der FPP-Zyklase und der FPP-Synthetase kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich bei der FPP-Zyklase um eine Nebenaktivität der FPP-Synthetase handelt. Eine Bildung von Humulen und Germacren wurde von Saito und Rilling (87) als Nebenaktivität der Prenyltransferase aus Hühnerleber nachgewiesen. Allerdings wurden hierbei eine ganze Reihe anscheinend relativ unspezifisch gebildeter Sesquiterpene gefunden.
Bei Betrachtung der von Cane und Tillman bestimmten FPP-Zyklase-Aktivität zeigte sich, daß bei dieser Bestimmung zum Zeitpunkt maximaler PL-Bildung keine maximale spezifische Aktivität gefunden werden konnte. Auch aufgrund der Verwendung eines komplexen Mediums für Streptomyces UC 5319 wurde nur eine spezifische Aktivität von 0.030 nMol/mg/h gemessen (18).
Der FPP-Zyklase Test ist in der Form, in der er von Cane beschrieben wurde, aufwendig und zeitraubend, zumal die benötigten Substanzen nicht kommerziell erhältlich sind. Es wurde deshalb versucht, den Test unabhängig von der Synthese von ^{14}C-tt-FPP und Pentalenen zu machen. Nachdem dies zumindest für Messungen in Rohextrakten möglich war, steht damit ein Testverfahren zur Verfügung, das mit handelsüblichen Chemikalien durchgeführt werden kann und die gleichen Ergebnisse wie der beschriebene Test erbringt.

Aufgrund der beschriebenen Instabilität der FPP-Zyklase-Aktivität bestehen derzeit nur geringe Aussichten für eine erfolgreiche Reinigung der FPP-Zyklase. Bisher war erst die Isolierung monoterpenzyklisierender Enzyme z.B. aus Salvia officinalis möglich. Diese sind in der Lage, die stereospezifische Zyklisierung von GPP zu Monoterpenen unterschiedlicher Konfiguration zu katalysieren (38). Die gemeinsamen Eigenschaften solcher Monoterpenzyklasen bestehen in einem Molekulargewicht von 50 - 100 000 und einem pH-Optimum zwischen 6.0 und 7.5. Sie werden alle durch thiolgerichtete Reagenzien und anorganisches Pyrophosphat gehemmt. Sie benötigen ohne Ausnahme zweiwertige Kationen zur Aktivität. Da bei der Reinigung dieser Enzyme mit Ausnahme hoher

Konzentrationen von Glycerin, Dithioerythrol und Polyvinylpyrrolidon keine besonderen Verfahren notwendig waren, sollte grundsätzlich auch eine Reinigung von FPP-Zyklase aus Streptomyceten möglich sein. Hierbei könnte beim Enzym aus S.arenae TÜ 469 ein Vorteil darin bestehen, daß von höherer spezifischer Aktivität ausgegangen werden kann und keine störende Phosphatase-Aktivität auftritt.
Nachdem Sagami von einer Steigerung der Aktivität von FPP-Synthetasen durch Zinkionen berichtete (86), sollte die Auswirkung von Zn^{2+} auch auf die Aktivität der FPP-Zyklase untersucht werden.
Sowohl ^{14}C-IPP als auch ^{14}C-FPP werden von Rohextrakten aus S.arenae TÜ 469 bei Ausschluß von O_2 zu ausschließlich einem Terpenderivat, dem Pentalenen, verstoffwechselt. Humulen als Übergangsverbindung wird in der Konformation synthetisiert, die für die weitere Zyklisierung innerhalb des Rings notwendig ist. Nach Cane (17) liegt das Carbokation des Farnesylrests bzw. des Humulens zusammen mit dem Pyrophosphat-Magnesium-Anion als Ionenpaar vor, das im aktiven Zentrum der FPP-Zyklase gebunden ist, bis die Umsetzung abgeschlosen ist. Nur durch einen derartigen Mechanismus kann die Stereospezifität der Reaktion ermöglicht werden. Dies ist gleichzeitig eine Erklärung für die fehlende Freisetzung von Humulen. In S.arenae konnte auch gaschromatographisch kein freies Humulen nachgewiesen werden.

Die Synthese eines einzigen Sesquiterpens bei S.arenae überraschte insbesonders beim Vergleich mit pflanzlichen Aktivitäten, bei denen i.a. verschiedenen Monoterpene und Sesquiterpene gebildet werden. So findet z.B. bei den gereinigten Enzymen aus Salvia officinalis (38) keine spezifische Produktbildung statt. Bei der FPP-Zyklase in Streptomyceten handelt es sich folglich um ein ausgesprochen substrat- und produktspezifisches Enzym zur Synthese eines Sekundärmetaboliten.

4.5 Regulation der Pentalenolacton-Synthese

Wie zu Beginn der Arbeit angenommen worden war, konnten anhand von Untersuchungen zur Biosynthese von PL Hinweise auf die Regulation der PL-Bildung erhalten werden. Diese Ergebnisse sollen im folgenden nochmals dargelegt und in ihrer Relevanz für die PL-Bildung diskutiert werden.

4.5.1 Regulation über die Aktivität der Biosyntheseenzyme

Anhand der Messung der spezifischen Aktivität der Biosyntheseenzyme und dem Vergleich ihres Verlaufs mit dem Verlauf der spezifischen Produktbildungsrate konnte geschlossen werden, daß die Aktivität der FPP-Zyklase limitierend für die PL-Bildung zu sein scheint. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, wonach der Sekundärmetabolismus enzymlimitiert sei, im Gegensatz zu einer Substratlimitierung des Primärmetabolismus (43). Die verschiedenen Messungen der HMG-CoA Reduktase Aktivität in der Rattenleber lassen allerdings auch dort eine Enzymlimitierung des Stoffwechselwegs vermuten. Die HMG-CoA Reduktase von S.arenae könnte neben der FPP-Zyklase infolge ihrer geringen Aktivität nach 100 bis 120 h Kultur ebenfalls zum Abbruch der PL-Synthese beitragen. Es bedürfte genauerer Messungen der HMG-CoA Reduktase Aktivität zu diesem Zeitpunkt, um hierüber eine Aussage machen zu können. Ebenso ist noch keine Aussage darüber möglich, ob eine Verbindung des PL-Synthesewegs durch Endproduktrepression auf die Bildung der HMG-CoA Reduktase und anderer Biosyntheseenzyme einwirken kann. Dies müßte in Kulturen auf komplexem Medium nach Zugabe von PL und ähnlichen Verbindungen bei anschließender Aktivitätsbestimmung der HMG-CoA Reduktase zu ermitteln sein.
Da die HMG-CoA Reduktase offenbar unabhängig von der FPP-Zyklase synthetisiert wird, scheint eine solche Endproduktrepression im Fall der HMG-CoA Reduktase unwahrscheinlich.

4.5.2 Regulation der PL-Bildung über Endprodukthemmung

Ganz offensichtlich besitzen die Produkte des PL-Synthesewegs hemmende Eigenschaften auf die Aktivität der FPP-Zyklase. Die Konzentrationen, die hierbei zu einer Hemmung führen, liegen im Fall des PL-Methyläthers im Bereich der Konzentrationen, die im Kulturfiltrat für das PL nachgewiesen wurden. Sofern diese Hemmungen von physiologischer Bedeutung sein sollen, müssen sie in Bezug zu den intrazellulären Konzentrationen gesetzt werden. Bisher kann über derartige Konzentrationen nur ausgesagt werden, daß PL offenbar auch wieder in die Zelle aufgenommen und verstoffwechselt werden kann, wie aus dem Verfütterungsexperiment mit ^{3}H-PL hervorging. Es gibt also keine Hinweise auf Permeationsbarrieren für PL. Außerdem ist Pentalenolacton nach Aufschluß von gewaschenen Zellen im Homogenat nachzuweisen. Insofern muß von einer physiologischen Bedeutung der Produkthemmung ausgegangen werden, über deren Ausmaß jedoch vorerst nur spekuliert werden kann. Derartige Feedback-Hemmungen sind relativ häufig bei Antibiotikaproduzenten anzutreffen (28,60,63). Die Tatsache, daß sowohl PL-Methyläther wie auch PL-Chlorhydrin die FPP-Zyklase hemmen, läßt vermuten, daß auch andere PL-Derivate Hemmwirkung besitzen. Möglicherweise sind die diesbezüglich aktivsten Verbindungen noch gar nicht gefunden. Es kann folglich vermutet werden, daß auf den substrat- und stereospezifischen Schritt der Pentalenensynthese eine Aufspaltung in eine Vielzahl von Folgeprodukten des Pentalenens durch die Wirkung unspezifischer Enzyme erfolgt. In diesem Zusammenhang müssen auch die neuesten Ergebnisse von Seto et al. (94) diskutiert werden. Aufgrund der Röntgenstrukturanalyse von verschiedenen Pentalenolactonmethylestern, die aus den Kulturfiltraten von S.chromofuscus und S.griseochromogenes gewonnen worden waren, fanden sie für das bisher als Pentalenolacton F bezeichnete Molekül eine, bezogen auf Pentalenolacton, epimere Struktur des C-9 Epoxids. Aus diesem Grund betrachten sie das nunmehr als Epipentalenolacton F bezeichnete Molekül als das Produkt eines Syntheseseitenwegs des Pentalenolactons. Aus den vorgelegten Ergebnissen und der zitierten Arbeit ergibt sich das in Abb. 41 dargestellte Bild der Isoprenoidsyn-

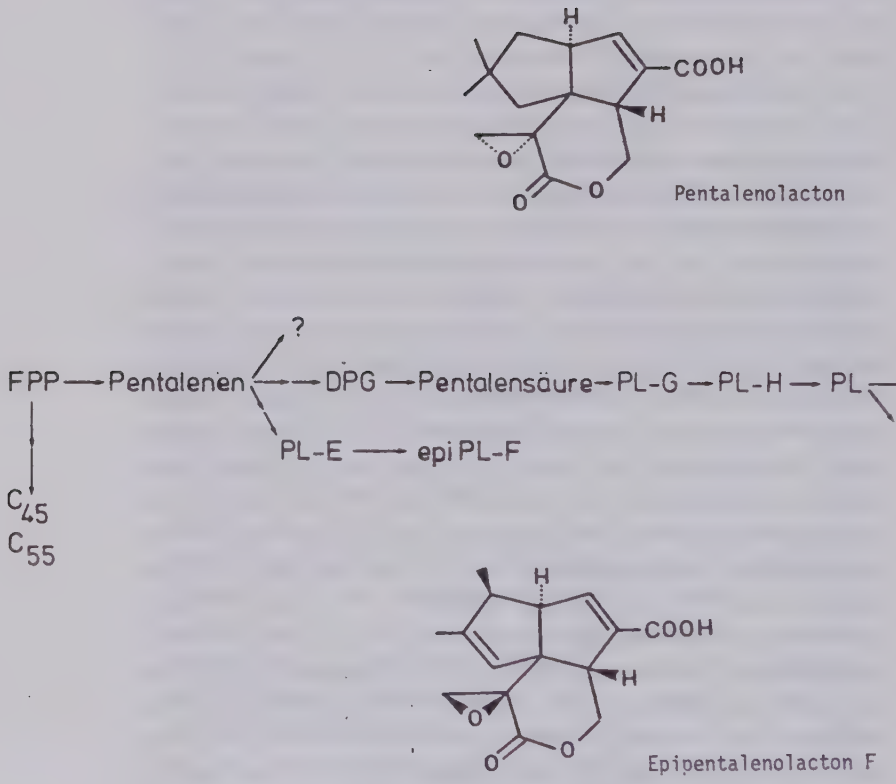


Abb. 41:
Hypothetisches Modell des Synthesewegs der Pentalenolactone
Veränderte Abbildung 4 aufgrund der Ergebnisse von Seto (94)
und der vorliegenden Arbeit. epiPL - Epipentalenolacton,
PL-O-Me - PL-Methyläther

these in S.arenae. Da Pentalenen die Ausgangsverbindung aller Sesquiterpene in S.arenae darstellt, kann angenommen werden, daß es sich bei einem Großteil der lipophilen Substanzen im Kulturfiltrat ebenfalls um Substanzen des PL-Synthesewegs handelt, so daß von diesem bisher nur Ausschnitte bekannt wären. Dies würde auch mit der beschriebenen großen Variation bei sehr vielen sekundären Metaboliten übereinstimmen (115).

Die bisher untersuchten PL-Derivate wurden alle aufgrund ihrer antibiotischen Wirkung bzw. ihrer Hemmwirkung auf GAPDH gefunden. Bereits bei der Untersuchung von Lipidtröpfchen, die S.arenae TÜ 469 bei der Reifung von Luftmycel und Sporen auf Agarplatten ausscheidet, konnten weitere bisher noch nicht identifizierte Hemmstoffe der GAPDH nachgewiesen werden. Die Zahl biologisch aktiver Verbindungen aus S.arenae ließe sich möglicherweise noch erhöhen, wenn auch ein Screening auf Hemmstoffe der FPP-Zyklase erfolgen würde.
Die Beobachtung, daß nur 1 - 3% von verfüttertem Pentalenen in bekannte PL-Derivate eingebaut wurde (18), paßt ebenso zu dieser Vorstellung weiterer Produkte des PL-Synthesewegs wie die große Zahl von nachgewiesenen Abbauprodukten von Pentalenen.
Nur die Tatsache, daß alle bisher untersuchten PL-Derivate sehr viel geringere GAPDH-Hemmaktivität zeigten als das PL-Epoxid oder das PL-Chlorhydrin, gestattet es, beim GAPDH-Hemmtest noch von der Konzentrationsbestimmung von Pentalenolacton zu sprechen. In Wirklichkeit liegt wohl eher ein Gemisch vieler verschiedener PL-Derivate vor.
Mit der Hemmung der FPP-Zyklase liegt neben der sehr viel schwächeren Hemmung der Pyruvat Kinase (56) eine weitere Einschränkung der Spezifität der PL-Hemmwirkung vor.

Es muß bei Versuchen einer weiteren Optimierung der PL-Produktion auch mit verstärkter Produkthemmung auf die Synthese oder mit verstärktem Abbau der gebildeten Produkte gerechnet werden. Vielleicht liegt hierin das Hauptproblem der geringen Produktion, die auch bei anderen PL-Produzentenstämmen beobachtet wurde (15).

4.5.3 Zusammenhang von PL-Bildung und spezifischem ATP-Gehalt

Bei der Beobachtung des starken Abfalls der spezifischen ATP-Konzentration in den Zellen wurde zunächst vermutet, daß aufgrund eines ATP-Mangels keine weitere Produktions- und Wachstumssteigerung beobachtet werden konnte. Durch Erhöhung der Asparaginkonzentration sollte das Medium hin zu besseren Wachstumsbedingungen optimiert werden, in der Hoffnung, keine Abnahme des ATP-Gehalts und dafür eine entsprechende Zunahme von Wachstum und PL-Bildung zu erhalten. Die PL-Bildung nahm zwar tatsächlich zu, doch die ATP-Abnahme war noch sehr viel stärker als zuvor.

Von einem sehr viel geringeren spezifischen ATP-Gehalt bei gesteigerter Produktion von Sekundärmetaboliten berichten auch Curdova (24) und Hänel (41). Allerdings erfolgt die Abnahme des spezifischen ATP-Gehalts bei den beschriebenen Beispielen lange vor Erreichen der maximalen Produktion. Infolgedessen könnte das zur Biosynthese fehlende ATP unter Umständen durchaus im Zusammenhang mit der Beendigung der PL-Bildung stehen.

Es scheint andererseits möglich zu sein, daß bei der in Kulturfiltraten gefundenen PL-Menge bereits eine Inaktivierung der PL-insensitiven GAPDH einsetzt. Die Konzentration von 56 µM PL im Kulturfiltrat nach Optimierung des Minimalmediums reicht im enzymatischen Test aus, die PL-insensitive GAPDH zu hemmen, wie aus dem Vergleich in Tab. 3 hervorgeht. Der ATP-Abfall wäre dann die Folge einer zumindest teilweise gehemmten Glykolyse. Durch Supplementierung von Pyruvat zum Zeitpunkt der maximalen PL-Produktion einer Kultur sollte es möglich sein, diese Frage zu klären, da hierdurch eine Hemmung der GAPDH umgangen werden könnte. Möglicherweise steht der ATP-Abfall auch in einem Zusammenhang mit einem regulatorischen Enzym des Stickstoffmetabolismus.

4.5.4 Hemmung der PL-Bildung durch Aminosäuren

Bei Untersuchung der PL-Produktion nach Zugabe von 0.1% der HMG-CoA-Vorstufe Leucin wurde festgestellt, daß Leucin zu einer 48 stündigen Hemmung der PL-Bildung führt. Ein ähnlicher Effekt wurde auch nach Zugabe von Glycin beobachtet. In beiden Fällen stieg die gebildete PL-Menge anschließend sogar geringfügig über den Kontrollwert an.

Unter Resting-cell Bedingungen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Aus diesem Grund kann eine direkte Wirkung von Leucin auf Enzyme der Biosynthese von PL ausgeschlossen werden. Da die Leucin-Wirkung nur auf wachsende Zellen erfolgt, lag der Gedanke an eine Art Katabolitrepression nahe. Eine Stickstoffquellenkatabolitrepression erfolgt jedoch i.a. auf Enzyme, die mit dem Stickstoffmetabolismus und seiner Regulation zusammenhängen. Denkbar wäre ein Einfluß von Leucin und Glycin auf ein Enzym wie die Glutaminsynthetase. Die Aktivität dieses Schlüsselenzyms des Stickstoffmetabolismus wird auch von Vargha und Szabo (109) nach Untersuchungen von Substanzen, die auf die Differenzierung von S.fradiae Mutanten einwirken, als möglicher Regulationsfaktor diskutiert.

Die Glutaminsynthetase in S.cattleya konnte von Streicher und Tyler (101) durch hohe Konzentrationen an Ammoniumionen in eine adenylierte Form überführt und dadurch inaktiviert werden. In E.coli scheint eine nicht-adenylierte Form der Glutaminsynthetase notwendig zu sein, um NH_4^+-kontrollierte Enzyme zu dereprimieren. Ein ähnlicher Fall einer Hemmung der Antibiotikasynthese durch N-Quellen ist für die Erythromycin-Bildung beschrieben worden. Smith et al. beobachteten eine Hemmung der Produktion sowohl durch Ammoniumchlorid als auch durch Glycin und Sojamehl (97).

Foster und Katz (37) berichten von der durch Glutaminsäure und andere Aminosäuren bewirkten Repression der Tryptophan Oxygenase, dem Schlüsselenzym sowohl der Synthese von NAD als auch von Actinomycin D. Gleichzeitig konnten sie die Induktion der Tryptophan Oxygenase durch Überführen der Zellen in Stickstoffquellenfreies Medium erreichen. Eine Beteiligung von c-AMP und c-GMP an dieser Regulation konnten sie ausschließen.

In S.viridochromogenes unterdrückt Glycin nach Coleman und Ensign (19) die Bildung von Luftmycel und Sporen, außerdem hemmt es das Wachstum. Aspartat, Glutaminsäure und Histidin zeigten keine ausgeprägten Effekte auf das Wachstum, und reprimierten zwar die Sporenbildung, nicht jedoch die Ausbildung von Luftmycel.
Auch Shapiro und Vining beschreiben in S.venezuelae unterschiedliche Produktion von Chloramphenicol in Abhängigkeit von der angebotenen Stickstoffquelle (96). Nach Messung der Enzymaktivitäten postulieren sie eine Regulation des Stickstoffmetabolismus durch die Glutamat Synthase und die Glutamat Dehydrogenase.
Sojamehl bewirkte auch in S.arenae eine Hemmung er PL-Bildung bei gleichzeitiger Wachstumssteigerung. Auch der Effekt des Wickerham Mediums dürfte dementsprechend ausschließlich auf seinem hohen Gehalt an Aminosäuren und Peptiden beruhen, da eine Glucose-Katabolitrepression durch Glucose in S.arenae ausgeschlossen werden konnte.
Möglicherweise hängt auch der produktionssteigernde Effekt von Asparagin bei S.arenae mit einer regulierenden Enzymaktivität wie z.B. der Glutamin Synthetase zusammen. Über einen Mechanismus, wie die Regulation des Stickstoffhaushalts in S.arenae mit der PL-Bildung verknüpft sein könnte, kann vorerst nur spekuliert werden. Eine Untersuchung der FPP-Zyklase Aktivität in Abhängigkeit von Leucin, das den Zellen zuvor zugesetzt wurde, wird derzeit unternommen. Ebenfalls soll die Aktivität der Glutamin Synthetase unter dem Einfluß verschiedener Stickstoffquellen untersucht werden, Erste Versuch zur Variation des Ammoniumgehalts des Mediums lassen erwarten, daß sich die Produktion von S.arenae noch weiter steigern läßt. Dies wäre ein weiteres Indiz für eine Verknüpfung von Stickstoffmetabolismus und PL-Synthese.

Angesichts der komplexen Regulation der PL-Bildung drängt sich die Frage nach dem Sinn der PL-Synthese für den Produzenten auf. Aufgrund der Beobachtung, daß Pentalenolacton bei der Sporenbildung von Luftmycel in Form feiner Tröpfchen abgeschieden wird, kann ein Zusammenhang der PL-Bildung mit der Differenzierung als möglich angesehen werden. Ein solcher Zusammenhang von Sekundärmetabolismus und Differenzierung wird auch in der neueren Litera-

tur als Möglichkeit diskutiert (28,115). In diesem Zusammenhang erscheint es notwendig zu sein, den Einfluß verschiedener Aminosäuren auch auf die Fähigkeit von S.arenae, Luftmycel und Sporen auszubilden , eingehend zu untersuchen.

4.5.5 Ausblick

Die Synthese von Pentalenolacton unterliegt der mehrfachen Regulation über Aminosäuren, limitierende Enzymaktivitäten und der Produkthemmung des limitierenden Enzyms FPP-Zyklase. Außerdem unterliegt das Produkt Pentalenolacton einer schnellen Metabolisierung. Die PL-Bildung hängt in erster Linie mit der Aktivität der FPP-Zyklase und der von ihr mit großer Spezifität katalysierten Bildung von Pentalenen zusammen. Das Enzym stellt deshalb ein ausgezeichnetes Studienobjekt zur Untersuchung von Enzymen des Sekundärmetabolismus dar.
Aufgrund der festgestellten Regulationsmechanismen müßte der Versuch unternommen werden, durch Protoplastenfusion verschiedener PL-produzierender und evtl. deregulierter Streptomycetenstämme zu höheren Produktionsraten zu gelangen. Da S.roseogriseus (DSM 40 488) nach den vorgenommenen Messungen durch komplexe Stickstoffquellen nicht in seiner PL-Produktion beeinflußt wird, wären Mutanten von S.roseogriseus ein interessanter Fusionspartner für Mutanten von S.arenae TÜ 469.
Darüber hinaus bieten sich nach den vorliegenden Ergebnissen weitere Untersuchungen auf genetischem Gebiet an. Angesichts der zunehmenden Fortschritte auf dem Gebiet der Streptomycetengenetik (45) scheinen Untersuchungen der FPP-Zyklase und der GAPDH-Gene im Bereich des Möglichen.
Nur durch genetische Untersuchungen ist z.B. die Hypothese der Existenz von zwei GAPDH-Genen zu beweisen. Für den Fall, daß sich die Klonierung des Gens für die PL-insensitive GAPDH in E.coli als möglich erweisen sollte, könnte durch Sequenzanalyse und anschließendem Vergleich der Sequenz mit GAPDH-Genen PL-sensitiver GAPDH (z.B. aus Hefe) eventuell weiterer Aufschluß über die Voraussetzung der Inaktivierung von sensitiver GAPDH durch PL

erhalten werden.
Auch die Klonierung und Rekombination des FPP-Zyklase Gens in Streptomyceten ist inzwischen aufgrund der Arbeiten von Hopwood et al. (45) denkbar. Hierdurch könnten neue Metabolite von Pentalenen gebildet werden. Allerdings muß in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß erst ein Teil der Pentalenenderivate aus S.arenae identifiziert ist.
Im Hinblick auf derartige Untersuchungen müßten zunächst geeignete Vektoren gesucht werden. Außerdem scheint es längerfristig notwendig zu sein, die Lage der Gene der PL-insensitiven GAPDH oder der FPP-Zyklase im Verhältnis zu anderen genetischen Markern auf dem Chromosom von S.arenae TÜ 469 zu kartieren.

Streptomyces arenae bildet PL in Minimalmedium während der Wachstumsphase, wobei gleichzeitig mit Beginn der PL-Synthese die PL-sensitive GAPDH-Aktivität verschwindet und PL-insensitive GAPDH gebildet wird. Im Verlauf der weiteren Kultur konnten noch spezifische Maxima der FPP-Zyklase-Aktivität sowie des ATP-Gehalts nachgewiesen werden. Die Regulation des Stickstoffmetabolismus könnte im Zusammenhang mit der Regulation dieser Aktivitäten stehen. Neben der Untersuchung der Glutamin Synthetase Aktivität sollten deshalb auch die Auswirkungen von Aminosäuren auf die Sporulation und die Luftmycelbildung in S.arenae TÜ 469 getestet werden. Falls die Glutamin Synthetase oder ein anderes regulierendes Enzym des Stickstoffmetabolismus die Differenzierung in S.arenae regulieren würde, wäre der Effekt auf die Bildung von Pentalenolacton in diesem Zusammenhang erklärbar.

5. Literaturverzeichnis

1 Allison, W.S.; Kaplan, N.O.
The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase
J.Biol.Chem. 239. 2140-2152 (1964)

2 Aizawa, S.; Akutsu, H.; Satomi,T.; Kawabata, S.; Sasaki, K.
AA-57, a new antibiotic related to pentalenolactone
J.Antibiotics 31. 729-731 (1978)

3 Anastasis, P.; Freer, I.; Picken, D.; Overton, K.; Sadler,I.; Sing, S.B.
The role of leucine in terpenoid metabolism. Incorporation of (2-^{13}C) and (3-^{13}C)-leucines into sesquiterpenoids by tissue cultures of Andrographis paniculata
J.Chem.Soc.Chem.Commun. 1189-1191 (1983)

4 Annis, G.D.; Paquette, L.A.
Total synthesis of (±) pentalenene
J.Am.Chem.Soc. 104. 4505-4506 (1982)

5 Atkinson, D.E.
Regulation of enzyme function
Ann.Rev.Microbiol. 23. 47-68 (1969)

6 Bergmeyer, H.U.
Methoden der enzymatischen Analyse
2 Bd., 3.Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1974)

7 Berndt, J.; Gaumert, R.
Eine vereinfachte Methode zur Bestimmung der Hydroxymethyl-glutaryl-CoA-Reduktase
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352. 345-350 (1971)

8 Bohlmann, F.; Zdero, C.
Senoxyden, ein neuer Kohlenwasserstoff aus Senecio oxyodontus
Phytochemistry 18. 1747-1748 (1979)

9 Bohlmann, F.; Jakupovic,J.; Ahmed, M.; Schuster, A.
Sesquiterpene lactones and other constituents from Schistostephium species
Phytochemistry 22. 1623-1636 (1983)

10 Bohlmann, F.; Wallmayer, M.; Jakupovic, J.; Ziesche, J.
Diterpene and sesquiterpene from Osteospermum species
Phytochemistry 22. 1645-1651 (1983)

11 Bradford, M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal.Biochem. 72. 248-254 (1976)

12 Bushell, M.E.; Fryday, A.
The application of materials balancing to the characterization of sequential metabolite formation in Str. cattleya NRRL 8057
J.Gen.Microbiol. 129. 1733-1741 (1983)

13 Cane, D.E.; Rossi,T.; Pachlatko, J.P.
The biosynthesis of pentalenolactone
Tetrahedron Lett. 38. 3639-3642 (1979)

14 Cane, D.E.; Iyengar, R.; Shiao, M.S.
Cyclonerodiol biosynthesis and the enzymatic conversion of farnesyl to nerolidyl pyrophosphate
J.Am.Chem.Soc. 103. 914-931 (1981)

15 Cane, D.E.; Rossi, T.; Tillman, A.M.; Pachlatko, J.P.
Stereochemical studies of isoprenoid biosynthesis of pentalenolactone from (U-^{13}C)Glucose and (6-^{2}H)Glucose
J.Am.Chem,Soc. 103. 1838-1843 (1981)

16 Cane, D.E.
Biosynthesis of sesquiterpenes p.283-374
in "Biosynthesis of isoprenoid compounds" Vol.1
Hrsg.: J.W. Porter, S.L.Spurgeon
John Wiley 1981

17 Cane, D.E.
Cell-free studies of monoterpene and sesquiterpene biosynthesis
Biochemical society transactions Vol.11
603 rd Meeting Liverpool 510-515 (1983)

18 Cane, D.E.; Tillman, A.M.
Pentalene biosynthesis and the enzymatic cyclization of farnesylpyrophosphate
J.Am.Chem.Soc. 105. 122-124 (1983)

19 Coleman, R.H.; Ensign, J.C.
Regulation of formation of aerial mycelia and spores of S.viridochromogenes
J.Bacteriol. 149. 1102-1111 (1982)

20 Collins,M.D.; Jones, D.
Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications
Microbiol.Rev. 45 316-354 (1981)

21 Colombó, A.L.; Crespi-Perellino, N. Micalicio, S.
Relationship between growth, cyclic AMP and Tylosin production in two mutants of Streptomyces fradiae
Biotechn.Lett. 4. 747-752 (1982)

22 Corcoran, J.W.
S-Adenosylmethionine:erythromycin C - O-Methyltransferase
Methods in Enzymology 43. 487-498 (1975)

23 Cornforth, R.H.; Popják, G.
Chemical synthesis of substrates of sterol biosynthesis
Methods of Enzymology 15. 359-390 (1969)

24 Curdova, E.; Kremen, A.; Vanek, Z.; Hostalek, Z.
Regulation of biosynthesis of secondary metabolites XVIII
Adenylate level and chlorotetracycline production in Str. aureofaciens
Folia microbiol. 21. 481-487 (1976)

25 Danishefsky,S.; Hirama,M.; Gombatz, K.; Harayama, T.; Berman, E.; Schuda, P.
Stereospecific total synthesis of d.l-pentalenolactone
J.Am.Chem.Soc. 100. 6535-6538 (1978)

26 Demain, A.L.
How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide
Ann. N.Y. Acad. Sci. 235 601-612 (1974)

27 Demain, A.L.
Catabolite regulation in industrial microbiology
in: "Overproduction of microbial products"
FEMS-Symposion 13 Academic Press (1982)

28 Demain, A.L.
Biology of antibiotic formation p.33-42
in:"Biotechnology of industrial antibiotics
Hrsg. E.J. Vandamme
Drugs and the pharmaceutical science Vol. 22
Verlag Marcel Dekker N.Y. (1984)

29 Drew, S.; Demain, A.L.
Effect of primary metabolites on secondary metabolism
Ann.Rev.Microbiol. 31. 343-356 (1977)

30 Dugan, R.E.
Regulation of HMG-CoA Reductase p.95-159
in "Biosynthesis of isoprenoid compounds
Hrsg. J.W.Porter, S.L.Spurgeon
John Wiley (1981)

31 Duszenko, M.; Balla, H.; Mecke, D.
Specific inactivation of glucose metabolism from
eukaryotic cells by pentalenolactone
Biochim.Biophys.Acta 714. 344-350 (1982)

32 Duszenko, M.
Untersuchungen zur Wirkungsweise von Pentalenolacton auf
Eukaryontenzellen, insbesondere auf den Energiestoffwechsel
von Trypanosoma brucei brucei
Dissertation Universität Tübingen (1983)

33 Edwards, P.A.; Lemongello, D.; Fogelman, A.M.
Improved method for the solubilization and assay of hepatic
3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase
J.Lip.Res. 20. 40-46 (1979)

34 English,A.R.; Mc Bride, T.J.; Lynch, J.E.
PA 132, a new antibiotic
II In vitro and in vivo studies
Antibiotics Annual 1956 -1957, 676-681

35 Erne, A.M.
Streptomyces antibioticus TÜ 1718, ein ß-Lactam und ß-Lactamase Produzent
Diplomarbeit Universität Tübingen (1981)

36 Fales, H.M.; Jaouni, T.M.; Babashak, J.F.
Simple device for preparing etheral diazomethane without resorting to codestillation
Anal.Chem. 45. 2303 (1973)

37 Foster, J.W.; Katz, E.
Control of actinomycin D biosynthesis in Streptomyces parvullus: Regulation of tryptophan oxygenase activity
J.Bacteriol. 148. 670-677 (1981)

38 Gambliel, H.; Croteau, R.
Pinene cyclases I and II
J.Biol.Chem. 259. 740-748 (1984)

39 Gersch,D.; Römer, W.; Bocker, H.; Thrum, H.
Variations in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in antibiotic producing strains of Streptomyces hygroscopicus
FEMS Microbiol.Lett. 3. 39-41 (1978)

40 Grein, S.
Untersuchungen zur antibiotischen Wirkung mehrerer Sesquiterpenlactone und zu ihrem Einfluß auf den Stoffwechsel von Bacillus brevis
Diplomarbeit Universität Tübingen (1984)

41 Hänel, F.; Gräfe, U.; Friedrich, W.; Bormann, E.J.
ATP levels in phosphate deregulated and arsenate-resistant mutants of Str. noursei
Z.Allgem.Mikrobiol. 24. 239-245 (1984)

42 Hartmann,S.; Neef, J.; Heer,U.; Mecke, D.
Arenaemycin (pentalenolactone), a specific inhibitor of glycolysis
FEBS Lett. 93. 339-342 (1978)

43 Hasenböhler, A.
Instrumentierung von Fermentationsanlagen
Dissertation Universität Tübingen (1978)

44 Holloway, P.W.; Popjak, G.
The purification of 3,3-dimethylallyl- and geranyltransferase and of isopentenyl pyrophosphate isomerase from pig liver
Biochem.J. 104. 57-70 (1967)

45 Hopwood, D.A.; Bibb, M.J.; Bruton, C.J.; Chater, K.F.; Feitelson, J.S.; Gil, J.A.
Cloning Streptomyces genes for antibiotic production
Trends in Biotechnology 1. 42-48 (1983)

46 Hostalek, Z.; Behal, V.; Novotna, J.; Erban,V.; Curdova, E.; Jechova, V.
Regulation of expression of chlortetracycline synthesis in Streptomyces aureofaciens p. 47-61
in." Overproduction of microbial products"
FEMS-Symposion 13 Acad.Press (1982)

47 Jenke, H.S.; Löwel, M.; Berndt, J.
In vivo effect of cholesterol feeding on the short term regulation of hepatic hydroxymethylglutaryl Coenzyme A reductase during the diurnal cycle
J.Biol.Chem. 256. 9622-9625 (1981)

48 Kawai, F.; Kimura, T.; Tani, Y.; Yamada, H.
Involvement of polyethylene glycol (PEG)-oxidizing enzyme in the bacterial metabolism of PEG
Agric. Biol.Chem. 48. 1349-1351 (1984)

49 Keller-Schierlein, W.; Lemke, J.; Nyfeler, R.; Zähner, H.
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen
105. Mitteilung Arenaemycin E,D und C
Arch. Mikrobiol. 84. 301-316 (1972)

50 Kendrick, K.E.; Ensign, J.E.
Sporulation of S.griseus in submerged culture
J.Bact. 155. 357-366 (1983)

51 Khokhlov, A.S.
Low molecular weight microbial bioregulators of secondary metabolism p.97-103
in:"Overproduction of microbial products"
FEMS-Symposion 13 Acad.Press N.Y. (1982)

52 Kniep, B.; Grisebach, H.
Biosynthesis of streptomycin
Eur.J.Biochem. 105. 139-144 (1980)

53 Koe, B.K.; Sobin, B.A.; Celmer, W.D.
PA-132. a new antibiotic
I Isolation and chemical properties
Antibiotics Annual 1956-1957 672-675

54 Lehmann, J.
Vergleichstest für Fermentationen
in:"Arbeitsmethoden für die Biotechnologie"
Hrsg.: DECHEMA Frankfurt/M. (1982)

55 Lehmann, J. et al.
Einfluß der Morphologie von S.arenae beim Scale-up
der Produktion von Pentalenolacton
in Vorbereitung

56 Lemke, J.
Arenaemycin, ein Antibiotikum aus Streptomyceten:
Untersuchung zur Isolierung, Identifizierung und
Wirkungsweise
Dissertation Universität Tübingen (1971)

57 Locci, R.; Sharples, G.P.
Morphology p.165-199
in:" The biology of the actinomycetes"
Hrsg.: M.Goodfellow, M.Mordarski, S.T. Williams
Acad.Press (1984)

58 Mann, K.; Mecke, D.
Inhibition of spinach glyceraldehyde-3-phosphate
dehydrogenase by pentalenolactone
Nature 282. 535-536 (1979)

59 Martin, D.G.; Slomp, G.; Mizsak, S.; Duchamp,D.J.; Chidester, C.G.
The structure and absolute configuration of pentalenolactone
Tetrahedron Lett. 56 4901-4904 (1970)

60 Martin, J.F.; Demain, A.L.
Control of antibiotic biosynthesis
Microbiol.Rev. 44. 230-251 (1980)

61 Maurer, K.H.
Untersuchung der Isoenzyme der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.12) aus Streptomyces arenae TÜ 469 und ihrer Regulation
Diplomarbeit Universität Tübingen (1981)

62 Maurer, K.H.; Pfeiffer, F.; Zehender,H.; Mecke, D.
Characterization of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes from the pentalenolactone producer S.arenae
J.Bacteriol. 153. 930-936 (1983)

63 Mendelovitz, S.; Aharonowitz, Y.
Regulation of cephamycin C synthesis, aspartokinase, dihydropicolinic acid synthetase and homoserine dehydrogenase by aspartic acid family amino acids in S.clavuligerus
Antimicrob.Agents Chemother. 21. 74-84 (1982)

64 Mikulik, K.; Vanek, Z.
Interrelationship between primary and secondary metabolism in actinomycetes
in: 12th FEBS-Meeting 1978 Vol.55 Symp. S8 199-208

65 Misumi, S.; Matsushima,H.; Shirahama, H.; Matsumoto,T
A conversion of humulene to hirsutene
Chem.Lett. 1982 855-858 (1982)

66 Narhi, L.O.; Fulco, A.J.
Phenobarbital induction of a soluble cytochrome P-450 dependent fatty acid monooxygenase in Bacillus megaterium
J.Biol.Chem. 257. 2147-2150 (1982)

67 Ohfune,Y.; Shirahama, H.; Matsumoto, T.
Formolysis of protoilludyl cation equivalents.
A new mode of rearrangement of bicyclo (4.2.0)oct-2-yl-cation
Tetrahedron Lett. 33. 2869-2872 (1976)

68 Ohtsuka, T.; Shirahama, H.; Matsumoto, T.
Synthesis of pentalenolactone E and F through biogenetic like cyclization of humulene
Tetrahedron Lett. 24. 3851-3854 (1983)

69 Okazaki, T.; Enokita,R.; Torikata, A.; Inukai, M.; Takeuchi,M.; Takahashi, S.; Arai,M.
Studies on actinomycetes producing pentalenolactone and its new related compounds
Ann.Rep.Sankyo Lab. 31. 94-103 (1979)

70 Paquette, L.A.; Schostarez, H.; Annis, G.D.
Total synthesis of (±) pentalenolactone methyl ester
J.Am.Chem.Soc. 103. 6526-6527 (1981)

71 Paquette, L.A.; Annis, G.D.; Schostarez, H.
An effective approach to stereocontrolled lactone annulation. Application to the total synthesis of pentalenolactone E methyl ester and a partiaö elaboration of quadrone
J.Am.Chem.Soc. 104. 6646-6653 (1982)

72 Paquette, L.A.; Annis, G.D.
Total synthesis of (±)pentalenene, the least oxidized neutral triquinane metabolite of Streptomyces griseochromogenes
J.Am.Chem.Soc. 105. 7358-7363 (1983)

73 Perez, L.; Lozada,R.; Cori, O.
Biosynthesis of allylic isoprenoid pyrophosphates by an enzyme preparation from the flavedo of Citrus paradisii
Phytochemistry 22. 431-433 (1983)

74 Pfeiffer, F.
Reinigung und Charakterisierung der Pentalenolacton-insensitiven Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (E.C. 1.2.1.12) aus dem Produzentenstamm Streptomyces arenae TÜ 469
Diplomarbeit Universität Tübingen (1980)

75 Picman, A.K.; Ranieri, R.L.; Towers, G.H.N.; Lam, J.
Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylenes om thin layer chromatograms
J.Chrom. 189. 187-198 (1980)

76 Pierce, J.; Suelter, C.H.
An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination
Anal.Biochem. 81 478-480 (1977)

77 Plieninger, H.; Immel, H.
Die Darstellung von reinem y,y-Dimethylallylpyrophosphat nach dem Verfahren von F.Cramer
Chem. Berichte 98. 414-418 (1965)

78 Popjak, G.
Enzymes of sterol biosynthesis in liver and intermediates of sterol biosynthesis
in: Methods of Enzymology 15 393-454 (1969)

79 Ragan, C.M.; Vining, L.C.
Intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and streptomycin production in cultures of Str. griseus
Can.J.Microbiol. 24. 1012-1015 (1978)

80 Richards, G.M.
Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA
Anal.Biochem. 57 369-376 (1974)

81 Righelato, R.C.
Growth kinetics of mycelial fungi p.79-103
in:"The filamentous fungi"
Hrsg.: J.E.Smith,D.R.Berry
Edward Arnold Ltd. London (1975)

82 Rodwell, V.W.; Bensch, W.R.
S-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase from Pseudomonas sp.
Methods in Enzymology 71. 480-487 (1981)

83 Rohmer, M.; Bouvier-Nave,P.; Ourisson,G.
Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes
J.Gen.Microbiol. 130. 1137-1150 (1984)

84 Ruettinger, R.T.; Olson,S.T.; Boyer,R.F.; Coon; M.J.
Identification of the ω-Hydroxylase of Pseudomonas oleovorans as a nonheme iron protein requiring phospholipid for catalytic activity
Biochem.Biophys.Res.Commun. 57. 1011-1017 (1974)

85 Sagami, H.; Ogura, K.; Seto, S.; Kurokawa, T.
A new prenyltransferase from Micrococcus lysodeicticus
Biochem.Biophys.Res.Comm. 85.572-578 (1978)

86 Sagami, H.; Ogura, K.; Weiner, A.; Poulter, C.D.
Effect of zinc ions on farnesyl pyrophosphate synthetase activity
Biochem.Int. 8 661-667 (1984)

87 Saito, A.; Rilling, H.C.
The formation of cyclic sesquiterpenes from farnesyl pyrophosphate by prenyltransferase
Arch.Biochem.Biophys. 208. 508-511 (1981)

88 Sakai, K.; Ohtsuka, T.; Misumi, S.; Shirahama, H.; Matsumoto,T.
Synthesis of pentalenic acid through biogenetic like cyclization of humulene
Chem.Lett. 1981 355-358 (1981)

89 Salas, J.A.; Guijarro, J.A.; Hardisson,C.
High calcium content in Streptomyces spores and its release as an early event during spore germination
J.Bacteriol. 155. 1316-1323 (1983)

90 Sanwal, B.D.; Zink, M.W.
L-Leucine dehydrogenase of Bacillus cereus
Arch.Biochem.Biophys. 94. 430-435 (1961)

91 Seto,H.; Sasaki, T.; Yonehara, H.; Uzawa, J.
Studies on the biosynthesis of pentalenolactone Part I. Application of long range selective proton decoupling (LSPD) and selective ^{13}C-(^{1}H)NOE in the structural elucidation of pentalenolactone G
Tetrahedron Lett. 10. 923-926 (1978)

92 Seto, H.; Sasaki,T.; Uzawa, J.; Takeuchi, S.; Yonehara, H.
Studies on the biosynthesis of pentalenolactone Part II. Isolation of pentalenic acid and pentalenolactone H
Tetrahedron Lett. 45. 4411-4412 (1978)

93 Seto, H.; Yonehara, H.
Studies on the biosynthesis of pentalenolactone Part III. Isolation of a biosynthetic intermediate hydrocarbon pentalenene
J.Antibiotics 23. 92-93 (1980)

94 Seto, H.; Noguchi, H.; Sankawa, U.; Itaka, Y.
Studies on the biosynthesis of pentalenplactone VI.
The X-ray crystal structure investigation of pentalenolactone G and structural revision of pentalenolactone F
J.Antibiotics 37. 816-817 (1984)

95 Shapiro, D.J.; Nordstrom,J.L.; Mitschelen, J.J.; Rodwell, V.W.; Schimke, R.T.
Micro assay for 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts
Biochim.Biophys.Acta 370. 369-377 (1974)

96 Shapiro, S.; Vining, L.C.
Nitrogen metabolism and chloramphenicol production in Str. venezuelae
Can. J.Microbiol. 29. 1706-1714 (1983)

97 Smith, R.L.; Bungay, H.R.; Pittenger, R.C.
Growth-biosynthesis relationships in erythromycin fermentation
Appl. Microbiol. 10. 293-296 (1962)

98 Sobin,B.A.; Celmer, W.D.; Koe, B.K.
United States Patent No 3.113.074 vom 3.12.1963
Antimicrobial agent from S.roseogriseus ATCC 12414

99 Spector, T.
Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation
Anal. Biochem. 86. 142-146 (1978)

100 Stahl, E.
Dünnschichtchromatographie
Ein Laboratoriumshandbuch
2. Auflage 1967
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, N.Y.

101 Streicher, S.L.; Tyler, B.
Regulation of glutamine synthetase activity by adenylation in the gram-positive bacterium Streptomyces cattleya
Proc. Natl. Acad. Sci. 78. 229-233 (1981)

102 Szumajster, J.
Regulation of bacterial sporogenesis
in: 33. Colloquium-Mosbach 1982, S.123-141
Biochemistry of differentiation and morphogenesis
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, N.Y. 1982

103 Takahashi, I.; Ogura, K.
Farnesyl pyrophosphate synthetase from Bacillus subtilis
J.Biochem. 89. 1581-1587 (1981)

104 Takahashi, S.; Takeuchi, M.; Arai, M.; Seto, H.; Otake, N.
Studies on biosynthesis of pentalenolactone V
Isolation of deoxypentalenylglucuron
J.Antibiotics 36. 226-228 (1983)

105 Takatsuji, H.; Nishino, T.; Miki, I.; Katsuki, H.
Studies on isoprenoid biosynthesis with bacterial
intact cells
Biochem.Biophys.Res.Comm. 110. 187-193 (1983)

106 Takeuchi, S.; Ogawa, Y.; Yonehara, H.
The structure of pentalenolactone (PA 132)
Tetrahedron Lett. 32. 2737-2740 (1969)

107 Takeuchi, S.; Uzawa, J.; Seto, H.; Yonehara, H.
New ^{13}C-NMR techniques applied to pentalenolactone
structure
Tetrahedron Lett. 34. 2943-2946 (1977)

108 Tillman, A.M.; Cane, D.E.
Pentalenolactone F, a new metabolite isolated from
Streptomyces. Isolation and structure elucidation
J.Antibiotics 36. 170-172 (1983)

109 Vargha, G.; Szabo, G.
Nutritional requirements for differentiation in a
Streptomyces fradiae mutant
Z.Allgem.Mikrobiol. 24. 189-199 (1984)

110 Venkitasubramanian, T.A.; Bhatnagar, R.K.; Seraswathy. S.
Rao, V.B.; Sivaswami, J.
Intermediary metabolism of Aspergillus parasiticus
in relation to aflatoxin biosynthesis
in:"Overproduction of microbial products" p.153-166
FEMS-Symposion 13. Acad.Press 1982

111 Walker, R.
The molecular biology of enzyme synthesis
John Wiley N.Y. (1983)

112 Weinberg, E.D.
Biosynthesis of secondary metabolites
Role of trace metals
Adv.Microbiol.Physiol. 4. 1-44 (1970)

113 Wittler, R.
Penicillinproduktion in Mammutschlaufenreaktoren
Dissertation Universität Hannover (1983)

114 Young, N.L.; Berger, B.
Assay of S-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
Methods in Enzymology 71. 498-509 (1981)

115 Zähner, H.
Mikrobieller Sekundärstoffwechsel
in: Handbuch der Biotechnologie
2.Auflage 1984 S.83-103
Hrsg.: P.Präve, U.Faust,W.Sittig,D.Sukatsch
Verlag Oldenburg

116 Zdunek, D.
Optimierung des Verfahrens zur Fermentation und
Aufarbeitung von Pentalenolacton aus Streptomyces
arenae TO 469
Diplomarbeit Universität Tübingen (1980)

117 Zdunek, D.
Wirkungsmechanismus, Spezifität und Bindungsstelle
des Glykolyse-Inhibitors Pentalenolacton
Dissertation Universität Tübingen (1984)

118 Zygmunt, W.A.
Oxytetracycline formation by Streptomyces rimosus
in chemically defined media
Appl. Microbiol. 9. 502-507 (1961)

Lebenslauf

Name:	Karl-Heinz Maurer
geboren am:	18. September 1953
Geburtsort:	Ravensburg
1960 - 1964	Grundschule in Ravensburg
1964 - 1973	Albert-Einstein-Gymnasium Ravensburg
im Juni 1973	Abitur
1973 - 1975	Wehrdienst
1975 - 1981	Biochemie-Studium an der Universität Tübingen
im Juli 1980	Mündliche Diplomhauptprüfung
1980 - 1981	Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr.D. Mecke am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen Thema: "Untersuchung der Isoenzyme der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (EC 1.2.1.12) aus Streptomyces arenae TO 469 und ihrer Regulation"
Oktober 1981 - Oktober 1984	Promotion bei Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen Thema: "Regulation der Biosynthese des Sesquiterpens Pentalenolacton in Streptomyces arenae TO 469"

Meine akademischen Lehrer waren folgende Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	D.Mecke, G.Weitzel, K.Eisele
	H.Probst, U.Weser, A.Wendel
Organische Chemie:	E.Bayer, M.Hanack, W.Voelter
Anorganische Chemie:	J.Strähle
Physikalische Chemie:	H.Mauser, W.Zeil, W.Braun
Mikrobiologie:	H.Zähner, V.Braun, H.Wolf
Pflanzenphysiologie:	H.Metzner, H.Ninnemann
Humanphysiologie:	E.Betz
Zoologie:	K.G.Grell
Botanik:	W.E.Mayer
Anatomie:	K.Mörike
Physik:	H.Krüger
Mathematik:	H.Pommer

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353